

INDICE

- I. Introduzione
- II. Biomateriali e Tecnologie di rilascio dei farmaci nella Farmacologia Rigenerativa
- III. Rigenerazione della vescica
- IV. Farmacologia Rigenerativa e Cellule Staminali:
 - A. Espansione in coltura di cellule staminali o progenitrici
 - B. Mobilizzazione di cellule staminali o progenitrici da porzioni di tessuto endogeno
 - C. Differenziazione a partire da cellule staminali multipotenti o unipotenti in linee cellulari specifiche
 - D. Differenziazione a partire da cellule staminali pluripotenti (Cellule ES o iPS) in linee cellulari specifiche
 - E. Riprogrammazione genetica e farmacologica per generare cellule staminali pluripotenti indotte (Cellule iPS)
- V. Possibili farmaci futuri: “Piccole molecole” riprogrammanti
- VI. Farmacologia Rigenerativa e Morbo di Parkinson
- VII. Rigenerazione cardiaca
- VIII. Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs)
- IX. Farmacologia Rigenerativa e Cancro
- X. Conclusioni

GLOSSARIO

BIBLIOGRAFIA

La Farmacologia della Medicina Rigenerativa

I. Introduzione

La Medicina Rigenerativa è un settore medico multidisciplinare in rapida evoluzione, con lo scopo di migliorare le tecnologie di riparazione e di sostituzione delle cellule, dei tessuti e degli organi danneggiati, per ripristinare le loro funzionalità.

La Farmacologia Rigenerativa applica le scienze farmacologiche a quelle mediche per accelerare ed ottimizzare, sia in vitro che in vivo, lo sviluppo e la maturazione di tessuti rigenerati e di derivazione biomedica.

L'obiettivo è modificare la fisiologia delle cellule, dei tessuti e degli organi, per accelerare, migliorare ed intensificare i loro risultati funzionali (Andersson and Christ., 2007).

La Farmacologia Rigenerativa punta a curare le diverse patologie tramite il recupero delle varie funzioni e, per questo motivo, si distingue da quella tradizionale, che solitamente si limita al sollievo palliativo dei sintomi.

Difatti, la ricerca e lo sviluppo farmaceutico si sono sempre focalizzati su composti con meccanismo d'azione sempre più selettivo e con peso molecolare di 500-800Da.

Questo ha senso se pensiamo ad un trattamento sintomatico della malattia, in cui ci si focalizza sul meccanismo d'azione primario richiesto per l'efficacia del farmaco e, contemporaneamente, si cerca di limitare gli effetti collaterali riducendo al minimo reazioni ed eventi avversi.

La Farmacologia Rigenerativa, ovvero la terapia curativa, utilizza invece, miscele complesse di composti, come fattori di crescita, per la rigenerazione delle funzioni degli organi e dei tessuti.

Questi ultimi hanno un peso molecolare molto più elevato rispetto a quelli normalmente sviluppati dall'industria farmaceutica: possono andare da 10000 a 100000 Da.

La *Figura 1* pone l'attenzione sui diversi stadi di un processo patologico e mette a confronto l'approccio della Farmacologia Rigenerativa con quello della Farmacologia Tradizionale.

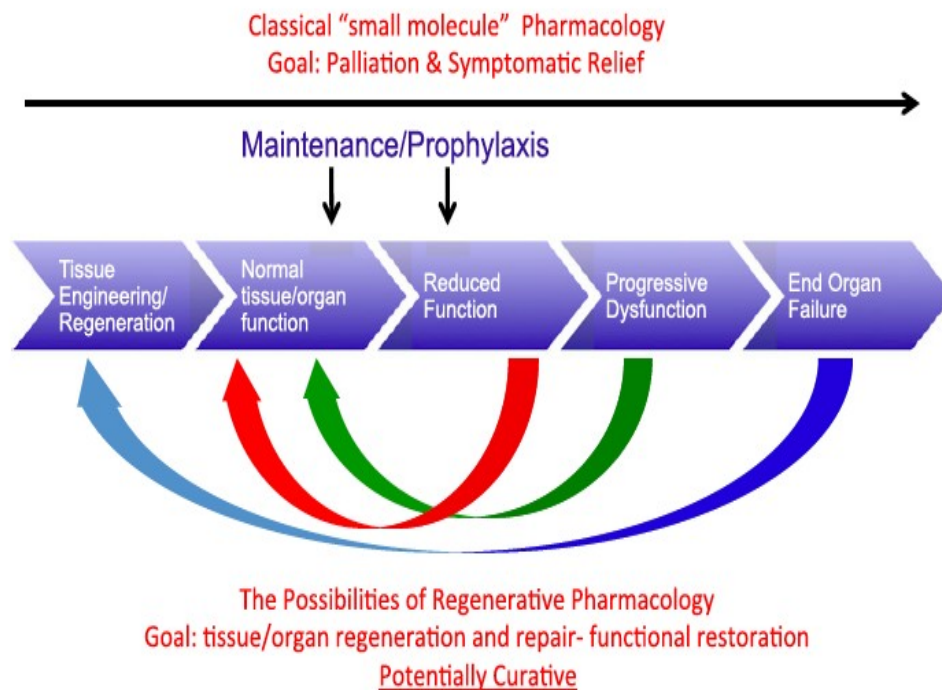


Figura 1. Farmacologia Rigenerativa e Farmacologia Tradizionale a confronto:

La figura mostra in modo schematico l'inizio, lo sviluppo e la progressione di un processo patologico, fino all'insufficienza d'organo.

L'obiettivo della Farmacologia Rigenerativa è quello di sviluppare una farmacologia potenzialmente curativa sfruttando vari approcci applicabili all'intero spettro di progressione della patologia del tessuto/organo.

Essa rappresenta un significativo punto di partenza dagli approcci più tradizionali focalizzati sul sollievo palliativo e sintomatico delle alterazioni patologiche. (Christ et al., 2013: The Pharmacology of Regenerative Medicine. Pharmacol Rev 65:1091-1133, July 2013)

Quello che si vuole sottolineare in *Figura 1* è che, se la Farmacologia Rigenerativa può intervenire durante l'intera progressione del processo patologico, quella tradizionale si limita al trattamento sintomatico delle disfunzioni d'organo/tessuto, in cui dev'essere necessariamente presente una quantità sufficiente di tessuto vitale per assicurare l'efficacia della cura (Christ et al., 2013).

Gli usi della Farmacologia Rigenerativa sono ampi:

Questi vanno dalle applicazioni per la profilassi a quelle per il miglioramento della funzionalità d'organo, fino alla sua totale sostituzione.

Occorre sottolineare che la Farmacologia tradizionale fornisce una chiave di volta essenziale per il continuo miglioramento della Medicina Rigenerativa e per la scoperta e lo sviluppo di Farmacoterapie innovative, tramite l'applicazione di procedimenti sia attivi che passivi:

L'approccio attivo consiste nell'utilizzo di fattori di crescita e di altri agenti farmacologici per modificare la crescita, la differenziazione e la funzionalità cellulare; l'approccio passivo utilizza invece metodi farmacologici per distinguere i tessuti rigenerati con meccanismi endogeni, da quelli modificati tramite l'Ingegneria Biomedica.

Entrambi gli approcci vengono attualmente impiegati nella Medicina Rigenerativa.

Le possibilità della Farmacologia Rigenerativa dipendono necessariamente dal grado di disfunzione del tessuto-organo:

Se in vivo resta sufficiente funzionalità, sia singole cellule (terapia cellulare), sia singole impalcature (terapia con biomateriali), possono fornire una risposta rigenerativa adeguata.

Al contrario, in carenza di tessuto vitale, la capacità rigenerativa endogena dell'organo/tessuto può non essere sufficiente e, di conseguenza, qualsiasi meccanismo endogeno di riparazione richiederà l'aiuto dell'Ingegneria Biomedica per produrre tessuti/organi bio-mimetici, simili cioè ai tessuti nativi (Christ et al., 2013).

L'ambiente attuale fornisce un'eccellente opportunità per introdurre realmente la Farmacologia nei campi della Medicina Rigenerativa e dell'Ingegneria Biomedica (Corona et al., 2010).

Tuttavia, gli ostacoli sono ancora molti:

- La capacità rigenerativa dei mammiferi non è illimitata;
- Le conoscenze necessarie a comprendere i complessi procedimenti farmacologici che sono alla base dei fenomeni riparativi sono ancora scarse;
- La Farmacologia dei processi rigenerativi è ancora in fase di sviluppo.

Dall'altro lato, il numero sempre minore di donatori d'organo e l'aumento continuo della durata della vita determinano un bisogno sempre maggiore di una Medicina che sia effettivamente “Rigenerativa”.

Questi limiti e bisogni richiedono una ricerca collaborativa globale e multidisciplinare nei diversi campi della Farmacologia, ricerca di Biomateriali, Ingegneria Biomedica,

nanotecnologie, ricerca su Cellule Staminali, biologia dello sviluppo e molto altro ancora.

Miglioramenti nei settori della biologia, della chimica e delle scienze dei materiali hanno portato allo sviluppo di biomateriali con funzionalità sempre più sofisticate, con lo scopo di:

- 1) Superare i limiti della Farmacologia tradizionale
- 2) Estendere il campo degli agenti terapeutici rilasciabili in circolo (Ad esempio: terapia genica, fattori con molecole ad elevato peso molecolare).

E' importante sottolineare che il grande ostacolo ad una terapia con rilascio sistemico sia, innanzitutto, quello di direzionare l'agente al suo sito d'azione nel tessuto interessato:

Questo comporta il raggiungimento del compartimento extravasale o l'uso di tecnologie per rilasciare più efficacemente l'agente terapeutico, inteso come farmaco, gene o composto.

Quando l'agente terapeutico arriva al tessuto bersaglio, l'ostacolo successivo consiste nella sua diffusione a livello locale attraverso le membrane del tessuto.

Alcuni di questi potenziali farmaci hanno target cellulari o subcellulari specifici ed il superamento delle barriere chimiche e strutturali della cellula stessa può rappresentare un fattore limitante.

La Medicina Rigenerativa non solo può sfruttare gli approfondimenti degli studi sulla rigenerazione, ma vantaggi significativi possono derivare anche dal miglioramento delle conoscenze e delle applicazioni della Morfogenesi, quindi il settore della biologia dello sviluppo.

Le molecole-segnaie extracellulari, note come “morfogeni”, modulano il percorso, il movimento e l'organizzazione cellulare durante la morfogenesi nell'embrione e nell'adulto (Wilson et al., 1997; Gurdon et al., 1998,1999; Gurdon and Bourillot, 2001; Brockes and Kumar., 2008; Wolpert., 2011; Rogers and Schier., 2011; Bentzinger et al., 2012) e, dal momento che i fattori di crescita, le citochine e gli ormoni contribuiscono alla morfogenesi, la loro distribuzione su larga scala diventa necessaria per la formazione e lo sviluppo del tessuto.

Poiché la loro attività viene influenzata dai rispettivi profili di diffusione, dai gradienti di concentrazione effettivi e dai rapporti concentrazione/risposta, sono necessarie nuove

tecnologie di veicolazione e di rilascio di farmaci che assicurino che il gradiente di concentrazione del morfogene sia effettivamente idoneo per l'utilizzo terapeutico. Poiché l'obiettivo più importante della rigenerazione consiste nella capacità di restaurare le funzioni fisiologiche, la fisiologia complessiva degli organi e dei tessuti dev'essere modificata con le tecniche dell'Ingegneria Biomedica per rilasciare complesse miscele di componenti ad elevato peso molecolare in una fascia spazio-temporale controllabile. Ad esempio, se la terapia oncologica veicola un gran quantitativo di farmaco chemioterapico alla cellula tumorale, la Farmacologia Rigenerativa rilascia il farmaco in modo controllato a livello spazio-temporale, riproducendo gli aspetti chiave della Morfogenesi degli organi e dei tessuti (Christ et al., 2013).

Mettendo insieme tutti questi aspetti la Farmacologia Rigenerativa si configura come settore multidisciplinare, dove i diversi campi della Farmacologia, della Medicina Rigenerativa e dell'Ingegneria Biomedica cooperano, si intrecciano e non sono più discipline separate e distinte tra loro.

Come schematizzato in *Figura 2*, la Farmacologia Rigenerativa assume un ruolo centrale per lo sviluppo della Medicina Rigenerativa e di terapie curative, traendo beneficio dal sinergismo di tre settori diversi:

- 1) Terapia tradizionale (Fisiologia e Farmacologia)
- 2) Ingegneria Biomedica
- 3) Biologia cellulare, Biologia dello sviluppo (Morfogenesi) e Genetica Molecolare.

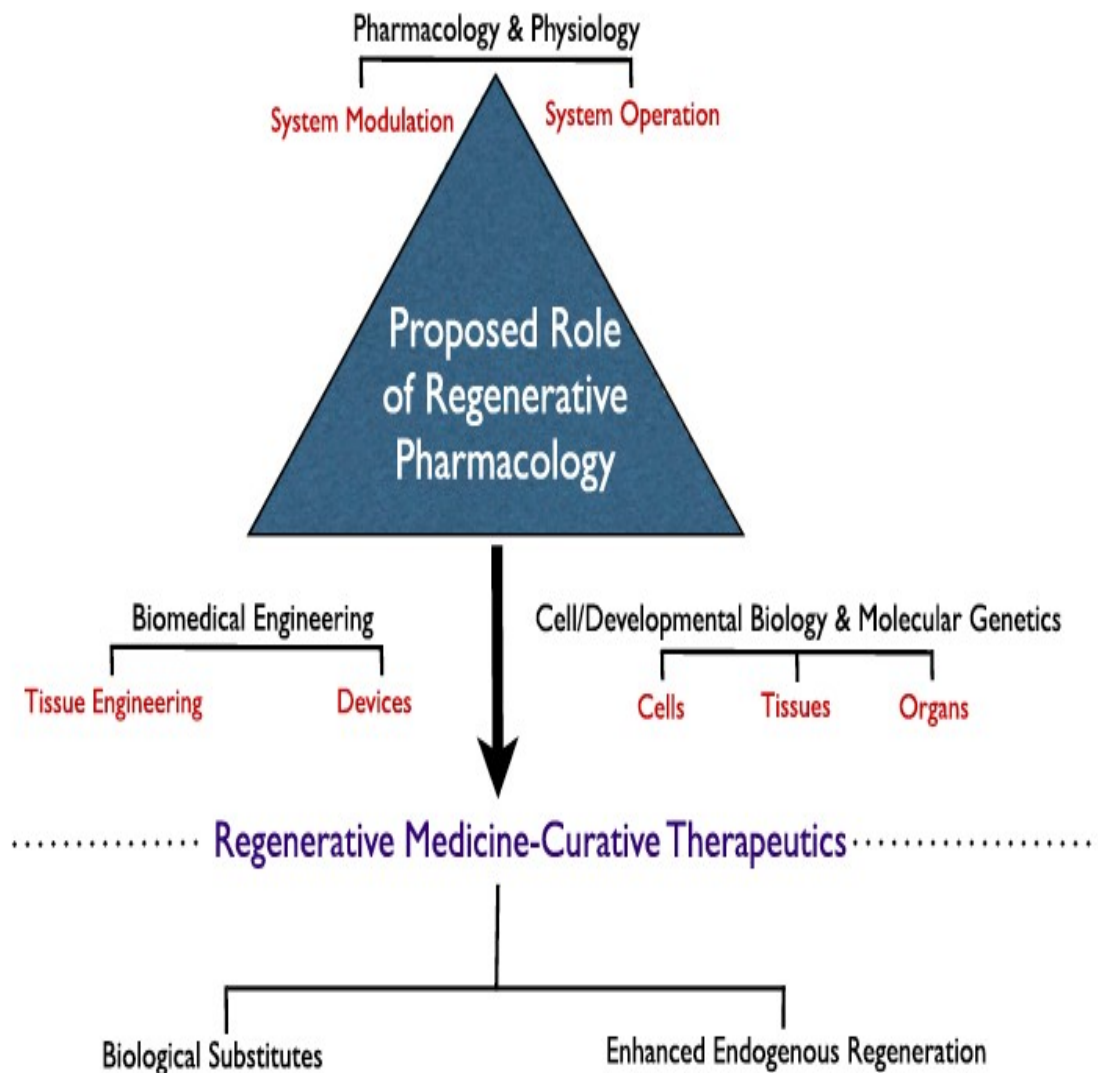


Figura 2. L'obiettivo della Farmacologia Rigenerativa:

1) La conoscenza del funzionamento del sistema biologico (Fisiologia) conduce alla modulazione di tale sistema (Farmacologia). Questo collegamento rappresenta la base della terapia tradizionale.

2) Ingegneria Biomedica

3) Biologia cellulare, Biologia dello sviluppo (Morfogenesi) e Genetica Molecolare.

Il sinergismo di queste discipline consente la creazione di nuove tecnologie che permettono di migliorare la rigenerazione in vivo e la produzione di "sostituti biologici" in vitro.

(Christ et al., 2013: The Pharmacology of Regenerative Medicine. Pharmacol Rev 65:1091-1133, July 2013)

II. Biomateriali e Tecnologie di rilascio dei farmaci nella Farmacologia Rigenerativa

I Biomateriali forniscono i costituenti di base per la creazione di nuovi tessuti ed organi poiché rappresentano la materia grezza da cui partire.

Essi servono da matrice provvisoria per le infiltrazioni cellulari e possono essere sfruttati come sistemi di veicolazione e di rilascio di farmaci (Williams., 2009).

La Farmacologia Rigenerativa può utilizzare diversi tipi di Biomateriali e di tecnologie per rilasciare gli agenti terapeutici in modo adeguato, come “Biomateriali Funzionalizzati” (Sistemi particellari e Sistemi ad impalcatura), tecnologie di Microfabbricazione e di riproduzione tridimensionale.

Per “Biomateriali Funzionalizzati” si intende quei Biomateriali in grado di guidare la funzione delle cellule per dirigere il loro destino cellulare.

Essi vengono definiti “Sistemi” e si distinguono in due classi:

- 1) Sistemi particellari
- 2) Sistemi ad impalcatura

I Sistemi particellari sono dei sistemi carriers, ovvero, microparticelle (microcarriers) o nanoparticelle (nanocarriers) per veicolare cellule e farmaci.

I Sistemi ad impalcatura stimolano la crescita o la rigenerazione delle cellule e dei tessuti.

I primi, talvolta, vengono incorporati nei secondi.

Indipendentemente dai metodi di fabbricazione e dalla realizzazione degli uni o degli altri, le classi di materiali utilizzati nel campo della farmacologia rigenerativa sono due: i polimeri sintetici e quelli naturali.

I più utilizzati sono i polimeri naturali a base proteica come il collagene, la fibrina, la laminina e la cheratina, che contengono tutti da tre a cinque sequenze di aminoacidi.

Essi sono in grado di promuovere il legame tra le cellule tramite vari tipi di interazioni, in particolare per mezzo dei siti di legame per le integrine.

Le integrine sono recettori di membrana costituiti da due polipeptidi (le subunità Alfa e Beta); questi recettori sono coinvolti nel collegamento tra il citoscheletro e la matrice extracellulare e, per questa ragione, svolgono un ruolo chiave nell’adesione fra le cellule.

Difatti, il vantaggio dei polimeri naturali è quello di promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare tramite le loro strutture leganti le cellule (Connelly et al., 2011; Sapir et al., 2011; Rafat et al., 2012).

I polimeri naturali polisaccaridici e quelli sintetici, viceversa, risultano privi dei siti di legame per le integrine, di conseguenza il loro utilizzo è più limitato e svantaggioso.

Molto spesso il rilascio di farmaci, "piccole molecole" o fattori di crescita non si verifica tramite processi di diffusione, ma dopo la degradazione dei sistemi carriers (Saul et al., 2011) e la modalità di degradazione ha implicazioni importanti sul rilascio, sull'accrescimento cellulare e sui processi rigenerativi.

Per "piccole molecole" si intende composti a peso molecolare non elevato in grado di attivare i processi di rigenerazione.

E' fondamentale realizzare una degradazione controllata per promuovere il rilascio dell'agente terapeutico o la riparazione del tessuto:

Nel caso dei polimeri naturali le sequenze proteolitiche sono, nella maggior parte dei casi, presenti intrinsecamente (David et al., 2012), in caso contrario si interviene con fattori esterni. In tutti i casi si sfruttano fattori di innesco idrolitici o proteolitici e, talvolta, si ricorre a cambiamenti di pH o di temperatura, enzimi, luce, ultrasuoni o altre fonti di energia (Balmayor et al., 2008; Narayanan et al., 2012; Nelson et al., 2012).

Sistemi particellari:

I sistemi particellari vengono realizzati per rilasciare gli agenti terapeutici a livello sistemico, migliorando la farmacocinetica (ad esempio, maggiore permanenza nel torrente circolatorio) e la farmacodinamica (ad esempio, maggiore specificità per il sito d'azione).

Il rilascio a livello sistemico degli agenti terapeutici da parte di sistemi carriers risulta molto vantaggioso poiché essi sono in grado di proteggere i fattori di crescita e gli acidi nucleici dalla degradazione enzimatica e dall'idrolisi.

I Nanocarriers, o sistemi nanoparticellari (5-200 nanometri), si basano soprattutto sull'utilizzo di sistemi autoassemblanti, come punti quantici, Liposomi, Polimerosomi e complessi catione-anione, per l'incapsulazione di piccole molecole come peptidi, acidi nucleici o proteine.

Le nanoparticelle, rispetto alle micro, forniscono la possibilità di raggiungere un grado più elevato di bersagli tessuto-specifici, tramite il raggiungimento del compartimento extravascolare.

I microcarriers, o sistemi microparticellari (1-200 micrometri), possono essere, così come i nanocarriers, di origine naturale o sintetica e sono in grado di rilasciare i singoli composti in modo continuo.

I microcarriers costituiscono un aspetto importante della farmacologia rigenerativa, soprattutto quando è richiesta una protezione delle cellule, che quindi vengono incapsulate fornendo l'agente terapeutico (Opara et al., 2010).

In questo modo le cellule diventano delle vere e proprie “Fabbriche” capaci di realizzare una vasta gamma di farmaci “naturali” e quindi possono essere considerate tra i migliori e più complessi “microcarriers per la veicolazione di farmaci” noti all'uomo.

Le cellule possono produrre agenti terapeutici che vanno da piccole molecole (AMP ciclico o ormoni), a peptidi e polipeptidi, fino a strutture proteiche di dimensioni maggiori.

Questi possono modulare numerose funzioni, tra cui la vasodilatazione, l'infiammazione, l'antiinfiammazione, le funzioni endocrine, la divisione, la migrazione ed il differenziamento cellulare (Christ et al., 2013).

I sistemi particellari sono fondamentali per ricreare in vivo i precisi contesti ambientali della Morfogenesi e, se applicati a bersagli vascolari corrispondenti a zone danneggiate, possono rilasciare farmaci promotori della riparazione vascolare (Shi et al., 2012).

Dopo essere rilasciato a livello sistemico, l'agente terapeutico viene direzionato alla zona specifica di danneggiamento vascolare grazie ai numerosi metodi di innescio che permettono il controllo sul tempo di rilascio per fare arrivare l'agente farmacologico nel compartimento intracellulare (Temperatura [Bessa et al., 2010], ultrasuoni [Borden et al., 2008], luce ed altri).

Il rilascio in siti specifici di danneggiamento vascolare può essere eseguito mediante l'accoppiamento del ligando bersaglio con la superficie esterna del nanocarrier-microcarrier (Omolola Eniola and Hammer., 2005; Banquy et al., 2008), mimando il comportamento di avvicinamento e adesione dei leucociti.

Le applicazioni di sistemi carriers con bersaglio tissutale o cellulare specifico stanno aumentando sempre di più nel campo della Medicina Rigenerativa:

- Il gene che codifica per il fattore di crescita IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), incapsulato in liposomi, se rilasciato tramite iniezione diretta, può aumentare la risposta agli stimoli lesivi (*Figura 3F*) (Jeschke et al., 2001);

- Le proteine Wnt, incapsulate in liposomi, sono molto importanti per le cellule staminali follicolari poiché mantengono intatta la loro attività e portano all'ispessimento del derma e alla neogenesi dei follicoli piliferi nel topo (Morrel et al., 2008);

Per proteine Wnt si intende una famiglia di glicoproteine caratterizzate da numerosi residui di cisteina. Esse sono coinvolte in numerosi processi embriogenetici, fisiologici ed omeostatici, ma anche in diverse condizioni patologiche e nel rinnovamento delle cellule staminali.

Le glicoproteine Wnt agiscono come molecole segnale in grado di attivare più vie intracellulari, tra cui la via Wnt/Beta-catenina, importante per la regolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare.

- I Nanocarriers stanno prendendo sempre più campo per la veicolazione ed il rilascio di vaccini (*Figura 3H*) (Reddy et al., 2007; Foster et al., 2010).

Essi proteggono gli antigeni, prolungano il rilascio e superano gli ostacoli biologici attribuibili alle piccole dimensioni delle tecnologie carriers.

I parametri chiave per migliorare il rilascio sistemico degli agenti terapeutici per mezzo di tecnologie carriers, sono:

- I costituenti chimici del sistema (Gratton et al., 2008);
- Il diametro e la forma del carrier (Gratton et al., 2008);
- La carica di superficie (Georgieva et al., 2011);
- La presenza di strutture bersaglio (Ng et al., 2009).

Come illustrato in *Figura 3*, i Sistemi particellari possono avere forme e dimensioni diverse; ad esempio, gli antigeni possono essere incapsulati dentro polimeri approvati dalla FDA (*Food and Drug Administration*), con diametri che vanno da alcune a centinaia di nanometri, fino a pochi micrometri (*Figura 3H*) (Demento et al., 2012).

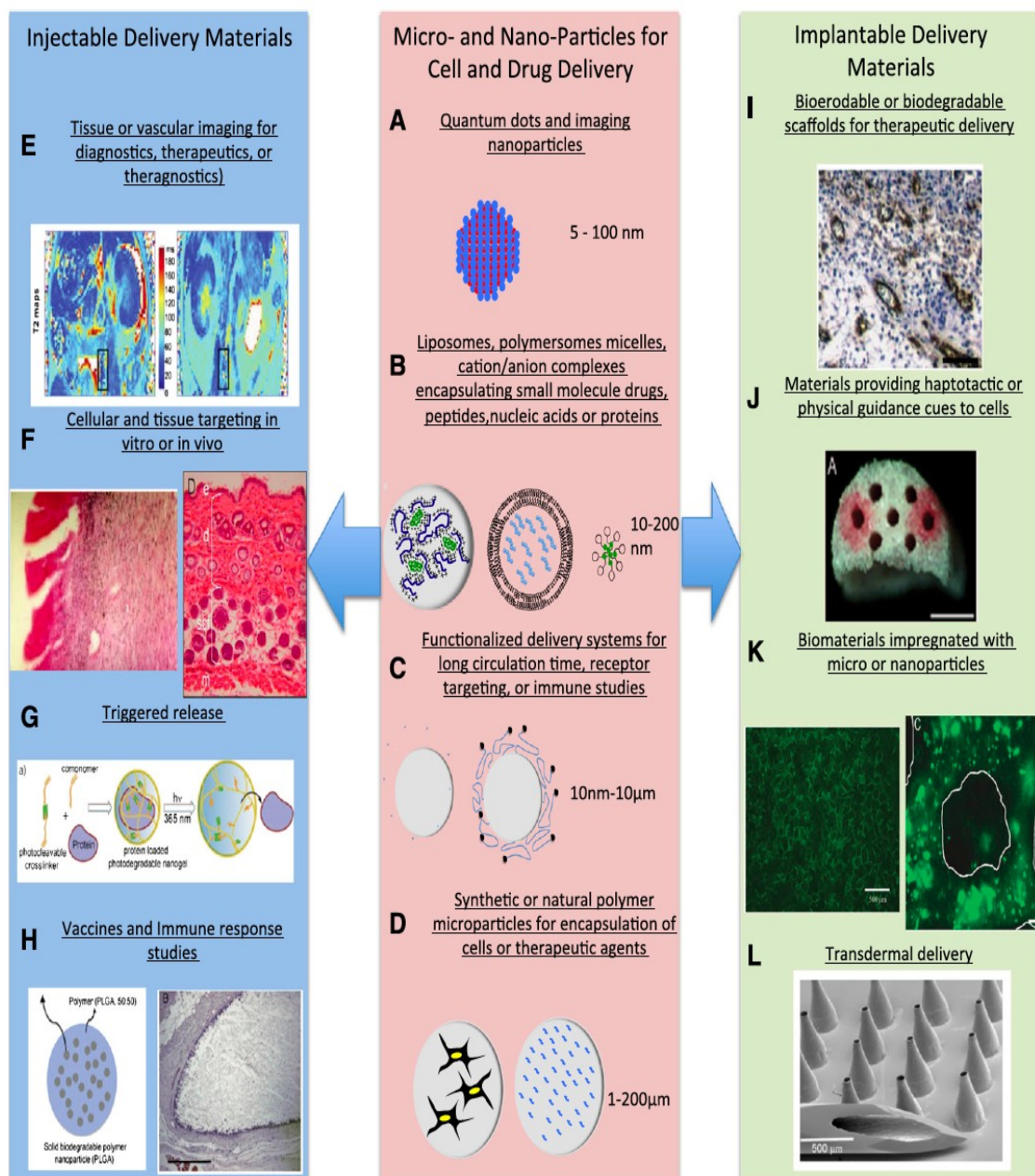


Figura 3. Le diverse forme dei sistemi particellari (Sistemi Carriers):

Sono raffigurati schematicamente i vari sistemi di micro e nanoparticelle.

Figura 3F. Veicolo plasmidico che trasporta il gene che codifica per IGF-1 (Insulin-like growth factor 1).

Figura 3H. Incorporazione di antigeni in microparticelle e nanoparticelle per migliorare la distribuzione dei vaccini.

(Christ et al., 2013: The Pharmacology of Regenerative Medicine. Pharmacol Rev 65:1091-1133, July 2013)

Sistemi ad impalcatura:

I sistemi ad impalcatura vengono utilizzati con lo scopo di rigenerare un tessuto specifico.

Per prima cosa occorre realizzare la struttura dell'impalcatura, secondariamente si introduce la porosità nelle cellule tramite la tecnica del “Leaching particellare” (Wright et al., 2010), o quella di “separazione di fase” (Nam and Park., 1999).

La porosità è utile perchè garantisce l'interconnessione tra i pori, in modo che le cellule siano in grado di attraversare le strutture per promuovere la formazione ottimale del tessuto.

Con la tecnica del “Leaching” una particella insolubile in un determinato solvente viene fusa con un polimero solubile nello stesso solvente.

Dopo evaporazione del solvente quello che resta viene posto in un secondo solvente, in cui è solubile la particella, ma non il polimero.

Dopo aver introdotto la porosità nelle cellule, si conferiscono all'impalcatura le giuste proprietà meccaniche per ottenere la risposta cellulare desiderata.

Quindi, si applicano tecniche di “Elettrospinning” e di Microfabbricazione per incorporare micro e nanoparticelle e segnali di direzionamento topografici.

La tecnologia di “Elettrospinning”(*Figura 4*) è nata come tecnica di fabbricazione tessile (Elettrofilatura), ma recentemente si utilizza anche nel campo dell'Ingegneria Biomedica (Greiner and Wendorff., 2007; Sill and Von Recum., 2008):

Un polimero viene prima disciolto in un solvente e poi spruzzato tramite un piccolo orifizio (in genere un ago); successivamente si applica un campo elettrico tra l'orifizio ed il dispositivo di raccolta, ed infine si ottengono delle fibre sottilissime dell'ordine di alcuni nanometri (nanofibre), in grado di fornire direzionamenti topografici alle cellule.

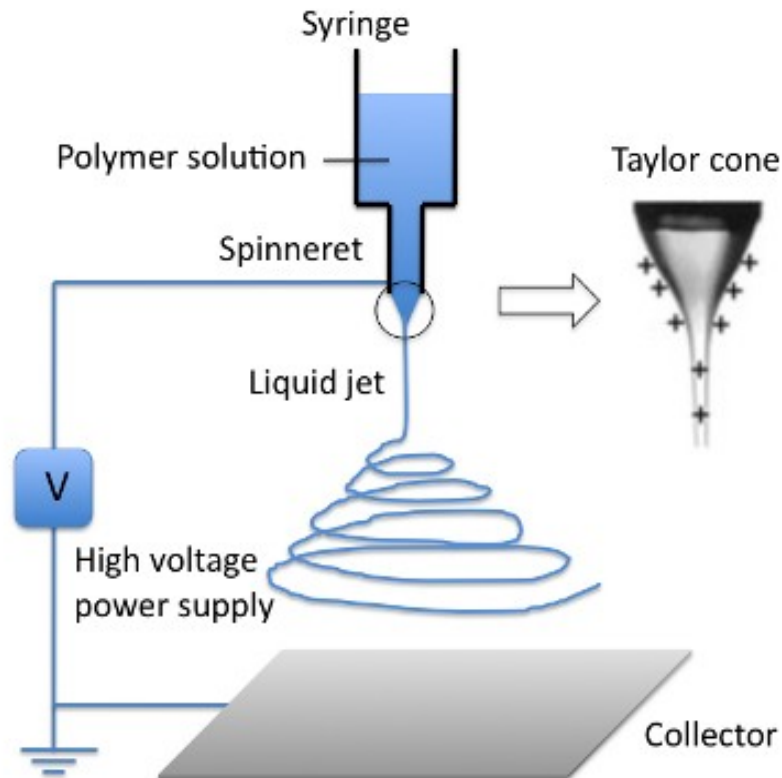


Figura 4. Principi base della tecnica di Elettrospinning (Electrospinning).

(Li F, Zhao W and Song Y (2010). Nanofibers, chapter 22, Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning. Doi: 10.5772/8166)

Recentemente, per fabbricare impalcature con un'organizzazione strutturale estremamente precisa, si è ricorsi alla riproduzione tridimensionale (in 3D) o alla fabbricazione di solidi in forma libera.

A questo proposito è importante sottolineare che alcuni tipi di materiali (Idrogeli, polimeri biodegradabili) risultano più compatibili di altri: quelli meno compatibili possono essere modificati con elementi “riempitivi” in modo da rendere comunque possibile la riproduzione in 3D.

La riproduzione tridimensionale si può realizzare tramite la tecnica del “Bioprinting”, ovvero le cellule ed i materiali vengono creati simultaneamente ricalcando le architetture del tessuto nativo (Boland et al., 2006; Mironov et al., 2009; Jakab et al., 2010; Chang et al., 2011; Marga et al., 2012).

Il “Bioprinting” è il processo di stampa delle cellule viventi o delle strutture corporee.

Esso rappresenta un'area della ricerca e dell'Ingegneria Biomedica in fase di sviluppo che coinvolge i dispositivi di stampa che depositano il materiale biologico. Questa tecnologia, illustrata in *Figura 5*, potrebbe essere utilizzata in futuro per ricreare parti di organi o interi organismi, a partire da materie prime biologiche.

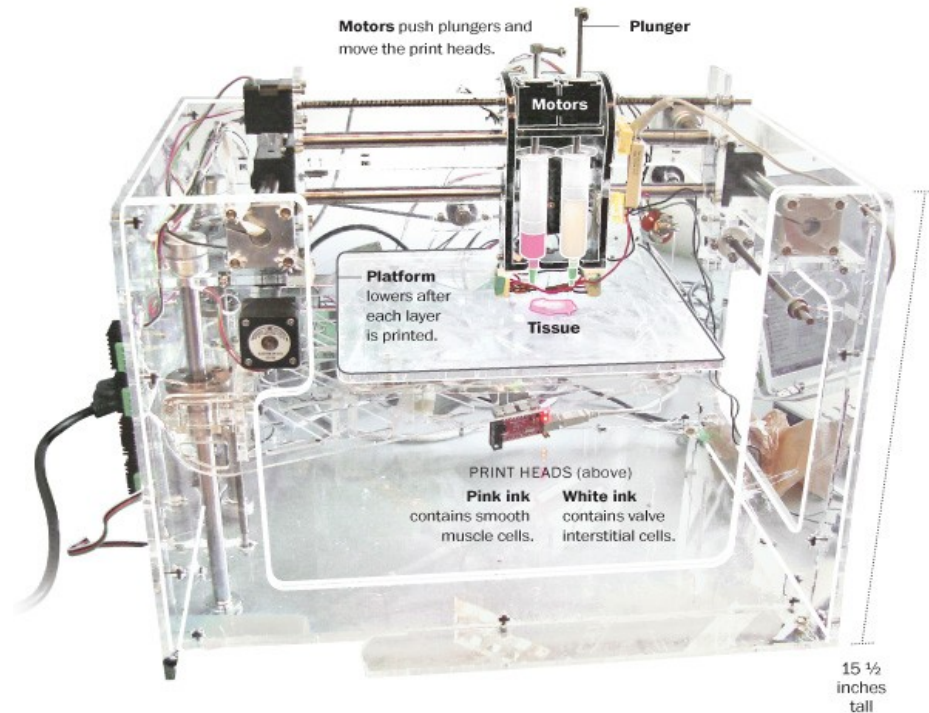


Figura 5. Struttura e funzionamento del Bioprinting.

(Bonnie Berkowitz and Todd Lindeman - The Washington Post. Published May 9, 2011)

Anche i “Bioreattori” permettono la creazione e l'assemblaggio dei tessuti e degli organi in modo tridimensionale.

Il “Bioreattore” è un dispositivo di laboratorio che racchiude in sé le caratteristiche rilevanti dell'ambiente fisiologico in vivo.

Esso serve per la creazione e la maturazione in vitro di un organo o di un tessuto:

Le cellule vengono seminate in un sistema particellare o ad impalcatura, poste in un bioreattore e sottoposte ad appropriati stimoli ambientali necessari alla formazione del tessuto-organo e alla sua funzione (Christ et al., 2013).

Un bioreattore può essere utilizzato per realizzare in vitro una ricostruzione avanzata e tridimensionale, prima dell'impianto in vivo (Freed et al., 2006; Goldstein and Christ., 2009; Grayson et al., 2009; Corona et al., 2010; Badylak et al., 2012).

L'uso di specifici mezzi di coltura e di bioreattori facilita la produzione di popolazioni

cellulari uniformi per l'utilizzo clinico (Baghbaderani et al., 2011).

Dopo aver conferito all'impalcatura le giuste proprietà meccaniche, si promuove l'adesione, la migrazione ed il differenziamento cellulare attraverso stimoli chimici e fisici.

Infine, si adottano le procedure di degradazione opportune per rilasciare l'agente farmacologico nel tessuto bersaglio.

I materiali per le impalcature più comunemente usati sono i polimeri biodegradabili e gli idrogeli ma, a prescindere dal tipo di materiale utilizzato, l'impalcatura dev'essere compatibile con le colture e le infiltrazioni cellulari.

E' importante conoscere la risposta immunologica ai materiali impiantati poiché la scelta del biomateriale utilizzato potrebbe richiedere l'utilizzo di un antiinfiammatorio-immunosoppressore nel sito di impianto per migliorare la risposta biologica al materiale, facilitando il processo proliferativo (Norton et al., 2010).

Questi sistemi sono in grado di generare risposte infiammatorie sia istantanee che a lungo termine e possono portare ad un rilascio sostenuto di farmaco, con il rischio però di causare un lento accumulo a livello del loro sito d'azione (Christ et al., 2013).

I profili di rilascio dei farmaci possono variare da alcuni minuti, ad ore, o anni e possono essere utilizzati come spinta iniziale ai processi rigenerativi prolungati nel tempo.

I Biomateriali possono essere utili in molte circostanze, ad esempio nella prevenzione di alcune patologie cardiovascolari, nella modulazione delle cellule staminali e progenitrici, nel trattamento del diabete e di malattie genetiche, nella riduzione delle cicatrici e nella riparazione delle ferite:

- Nell'ambito delle patologie cardiovascolari è opportuno citare gli stents come esempi di sistemi di veicolazione di farmaci (Mani et al., 2007; Wessely., 2010), ma anche i pacemakers (Crossley., 2000; Santerre et al., 2005) ed i vasi sanguigni di derivazione biomedica (Peck et al., 2012).

I biomateriali usati in un approccio di tipo medico-rigenerativo rappresentano una delle tecnologie più promettenti per il recupero delle funzionalità del tessuto cardiaco dopo un infarto del miocardio e la loro struttura dovrebbe essere tale da permettere la loro biodegradazione una volta avvenuta la rigenerazione del tessuto cardiaco (Fujimoto et al., 2007a,b).

Questi sistemi risultano compatibili con il rilascio controllato di molecole protettive e stimolanti, come IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) e HGF (*Hepatocyte growth factor*) (Nelson et al., 2011).

Inoltre, alcuni derivati del poliuretano hanno mostrato delle proprietà meccaniche, come l'elasticità e la forza, che mimano quelle del tessuto cardiaco (Christ et al., 2013).

- Per la modulazione delle cellule staminali e progenitrici è stato dimostrato che, utilizzando geli poliacrilammidici, le cellule staminali mesenchimali (MSCs) possono essere trasformate in diversi tipi di cellule, come mioblasti e osteoblasti (Norton et al., 2010).

I direzionamenti topografici ed i segnali chimici rilasciati dalle impalcature possono guidare il comportamento ed il destino cellulare.

Ad esempio, un mix di fattori di crescita rilasciato da strutture di fibrina, ha promosso la differenziazione di cellule parentali neurali in cellule neuronali ed oligodendrociti, tramite metodi di binding dell'eparina (Willerth et al., 2008).

Inoltre, alcuni sistemi di rilascio neuroparticellare che determinano l'endocitosi, sono stati recentemente utilizzati per veicolare delle proteine coinvolte nella risposta a cascata delle Wnt, conducendo al differenziamento e alla proliferazione cellulare (Shah et al., 2011).

- Nel trattamento del diabete, per quasi trent'anni, si sono utilizzati degli idrogeli a base di alginati o di altri polimeri per incapsulare le cellule Beta-pancreatiche che producono l'insulina (Lim and Sun., 1980).

Tuttavia, questi biomateriali tradizionali non rilasciano l'insulina a lungo termine, proprietà richiesta nella cura del diabete di tipo I.

La veicolazione transdermica tramite microaghi a cui può essere collegato un sistema a reservoir di farmaco (Davis et al., 2005), risulta un approccio alternativo molto efficace, ora in fase di sperimentazione umana (Gupta et al., 2009).

Questa tecnologia presenta il grande vantaggio di bypassare lo strato corneo e di ridurre l'infiammazione ed il dolore.

- Nel trattamento delle malattie genetiche l'applicazione più brillante consiste nello sviluppo di sistemi di veicolazione non virale di geni per mezzo di carriers nanometrici rilasciabili a livello sistemico.

In questo contesto è stata dimostrata la capacità della Polietilenimmina di promuovere

l'uscita di DNA endosomiale.

Alcune di queste nuove strategie potrebbero portare benefici significativi nel trattamento su base genica del morbo di Parkinson (Christ et al., 2013).

Inoltre, un'innovativa terapia genica basata sulla correzione del genoma delle Cellule Staminali Ematopoietiche porta ad un notevole miglioramento nelle condizioni di pazienti affetti da due gravi malattie genetiche, la leucodistrofia metacromatica e la sindrome di Wiskott-Aldrich.

La leucodistrofia metacromatica è una malattia neurodegenerativa causata dal deficit dell'enzima ARSA (*Arylsulfatase A*), responsabile dello smaltimento dei sulfamidici nell'organismo.

Difatti, se queste sostanze non vengono smaltite, finiscono per accumularsi nel sistema nervoso e danneggiare irreversibilmente la mielina, con perdita progressiva delle capacità cognitive e motorie dei bambini.

La sindrome di Wiskott-Aldrich, invece, è causata da un difetto nel gene che codifica per una proteina presente nelle cellule del sangue, la Wasp (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*).

Questa malattia colpisce i bambini maschi e determina un deficit nel numero e nella grandezza delle piastrine, con problemi di sanguinamento anche fetali.

Un gruppo di ricercatori dell'istituto TIGET (*San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy*), guidato da Luigi Naldini, ha condotto alcuni studi su sei bambini provenienti da ogni parte del mondo.

Dopo tre anni di trattamento, gli studi hanno dimostrato di poter cambiare il corso di queste malattie genetiche e, al momento, i trial clinici stanno continuando per altri 12 pazienti.

Negli studi condotti, i geni corretti vengono inseriti nel genoma delle cellule staminali ematopoietiche prelevate dal midollo osseo dei piccoli pazienti, per mezzo del virus dell'HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) ingegnerizzato in modo da non essere più infettivo.

Il virus dell'HIV rappresenta quindi il vettore per la terapia genica e le cellule staminali riprogrammate vengono reinfuse nell'organismo dei pazienti (Aiuti et al., 2013).

•Per la riparazione delle ferite sono stati autorizzati all'immisione in commercio alcune matrici di tessuto rigenerativo, come AlloDerm.

AlloDerm promuove la rigenerazione dei tessuti in quanto consente la rapida rivascolarizzazione, la migrazione dei globuli bianchi alla zona lesa e lo sviluppo della popolazione cellulare, trasformandosi in tessuto ospite per garantire la riparazione naturale.

Alcuni materiali come l'acido ialuronico (Scuderi et al., 2008), il chitosano (Boucard et al., 2007) e gli idrogeli a base di alginati (Lee et al., 2009) vengono utilizzati nei trattamenti contro le bruciature e l'acne.

Alcuni antibiotici per la profilassi (Kim et al., 2008) e fattori di crescita (Fujihara et al., 2008) sono stati incorporati in materiali biologicamente attivi (Luo et al., 2010) per accelerare la rigenerazione cellulare.

Inoltre, alcuni peptidi sintetici che derivano dalle proteine delle gap junctions possono promuovere la riparazione del tessuto dopo l'impianto di biomateriali (Soder et al., 2009).

III. Rigenerazione della Vescica

La vescica (*Figura 6*) è un organo impari del nostro organismo nella quale si raccoglie l'urina proveniente dai reni prima di essere eliminata all'esterno attraverso l'uretra con l'atto della minzione.

La vescica ha la capacità di immagazzinare l'urina a volumi crescenti fino al suo completo svuotamento: questo si deve verificare senza l'aumento della pressione intravesicale e senza la nascita di contrazioni spontanee.

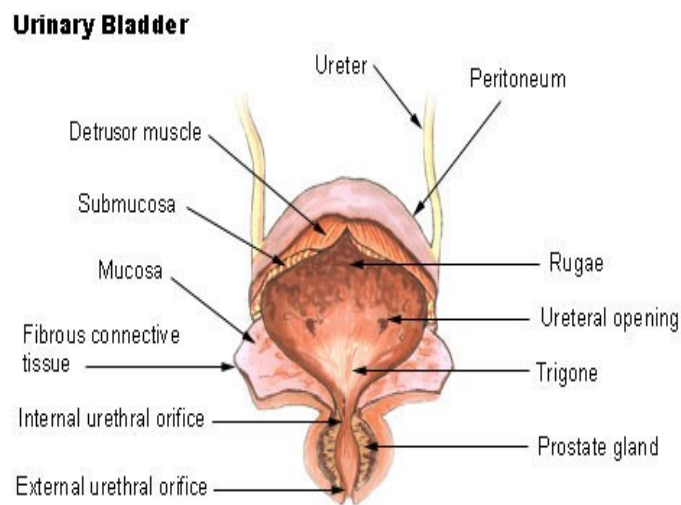


Figura 6. Anatomia della vescica urinaria umana:

Muscolo Detrusore della vescica / Trigono Vescicale / Strati parietali della vescica (epitelio urinario, tonaca muscolare propria, lamina propria).

(U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program)

I pazienti con vesciche poco funzionanti e poco rispondenti presentano diversi sintomi dei problemi delle basse vie urinarie, come l'aumento dell'urgenza e della frequenza di urinare, l'incontinenza e la nocturia, e sono soggetti a rischio di insufficienza renale: ciò li rende dei candidati per l'intervento chirurgico (Reyblat and Ginsberg., 2010).

Le malattie a carico della vescica possono essere causate da problemi strutturali, congeniti, neurologici o infiammatori, come danni al midollo spinale, Mielomeningocele, iperattività del muscolo detrusore, cistite da radiazioni, cistite interstiziale, sclerosi multipla e schistosomiasi.

In questi casi l'approccio standard prevede interventi di "Cistoplastica", ovvero

l'asportazione parziale o completa della vescica, sostituendola con un'ansa dell'Intestino Tenue (Ileocistoplastica) o del Colon (Colocistoplastica) (Christ et al., 2013).

La Farmacologia tradizionale, tramite approccio sintomatico, ha studiato varie classi farmacologiche, come i Farmaci antimuscarinici (Ossibutinina, Tolterodina, Solifenacin, Darifenacin), impiegati come medicinali di prima scelta nel trattamento della vescica iper-reattiva, e farmaci bloccanti dei recettori alfa-adrenergici, da soli o in combinazione con antimuscarinici e tossine botuliniche di tipo A (Andersson et al., 2009; Mangera et al., 2011).

Tuttavia, nei casi più gravi, i pazienti non rispondono a questi trattamenti sintomatici e i livelli pressori vescicali già alti possono ulteriormente aumentare causando il deterioramento delle vie urinarie anche superiori.

L'attenzione si è quindi spostata su alcune tecniche di Farmacologia Rigenerativa per realizzare strategie farmacologiche innovative.

Purtroppo, la rigenerazione funzionale ex-novo della vescica si verifica con variazioni specie-dipendenti (Lin et al., 1989), le nostre conoscenze riguardo questo processo rigenerativo sono ancora limitate e non siamo ancora in grado di selezionare le cellule o i biomateriali migliori.

Nonostante le difficoltà, la Farmacologia Rigenerativa è in fase di sviluppo:

- Si possono realizzare sistemi ad impalcatura;
- Si possono veicolare cellule staminali al sito di danneggiamento per garantire una miglior rigenerazione del tessuto vescicale ed una migliore integrazione con quello dell'ospite;
- Alcuni fattori di crescita, “piccole molecole” o altri composti, possono essere somministrati localmente e veicolati nell'organismo per migliorare la rigenerazione di questo organo.

Ad esempio, negli studi di Atala et al. (2006) su individui affetti da Mielomeningocele (Malformazione congenita caratterizzata dalla schisi di più vertebre della regione sacrolombare), si sono impiantate nuove vesciche seminando impalcature sintetiche di collagene o collagene ed acido poliglicolico, con cellule dell'epitelio urinario all'interno e cellule del muscolo liscio all'esterno.

Oppure, poichè la vescica possiede un potenziale rigenerativo unico che nessun altro organo, fegato incluso, possiede (Columbano and Shinozuka., 1996), alcune nuove

strategie puntano a sfruttare questa capacità rigenerativa intrinseca.

Difatti, numerosi studi hanno dimostrato che vesciche animali (Liang and Goss., 1963; Burmeister et al., 2010) e vesciche umane (Sisk and Neu., 1939; Liang., 1962; Tucci and Haralambidis, 1963) presentano un significativo potenziale rigenerativo dopo rimozione di buona parte dell'organo per mezzo di una cistectomia subtotale.

In particolare, tra i modelli animali, la vescica di roditore è quella più utilizzata per studiare il fenomeno rigenerativo della vescica.

Burmeister et al. (2010) hanno eseguito una cistectomia subtotale in topi femmina di dodici settimane. La tomografia computerizzata e la cistometria hanno mostrato che otto settimane dopo l'operazione la vescica è ricresciuta fino a raggiungere una dimensione normale e, dalle analisi istologiche, la lamina propria e gli strati muscolari del detrusore hanno ripreso il normale spessore.

Si è comunque verificata una diminuzione nella contrattilità del muscolo liscio, evidenziabile sottoponendo la vescica a stimolazione colinergica, per mezzo di un agonista muscarinico (Carbacolo) (*Figura 7B*).

Due settimane dopo l'operazione le risposte contrattili sono circa del 20% rispetto a quelle del gruppo di controllo, ma dopo otto settimane si verifica un parziale recupero, nonostante i valori massimi nella fase di plateau rimangono bassi (circa il 37% rispetto ai valori normali).

I dati ottenuti dalla curva concentrazione-risposta mostrano un aumento della contrattilità muscolare di tipo tempo-dipendente.

Nonostante la riduzione della contrattilità del muscolo liscio, dopo rimozione chirurgica del 70-80% del tessuto vescicale, si evidenzia una risposta rigenerativa motivata anche dal fatto che la risposta agli stimoli con campi elettrici mostra l'innervazione del nuovo tessuto.

La nuova vescica presenta tutti e tre gli strati parietali: epitelio urinario, tonaca muscolare propria e lamina propria.

In definitiva, in otto settimane, i roditori sottoposti a cistectomia subtotale possiedono una vescica rigenerata, strutturalmente e funzionalmente identica a quella nativa (Burmeister et al., 2010).

Uno studio di follow up più recente (Peyton et al., 2012) ha utilizzato la marcatura con BrdU (*Bromodeoxyuridine*), un marcatore specifico della risposta proliferativa nelle

prime settimane critiche post-operazione (*Figura 7C*).

In questo studio, meno dell'1% delle cellule della parete vescicale risultano marcate con BrdU nel gruppo di controllo in assenza di danni, ma questa percentuale aumenta da cinque a otto volte ad ogni esame di controllo post-cistectomia.

Come mostra la figura, sette giorni dopo l'intervento la percentuale di cellule marcate con BrdU nei tre strati parietali è simile.

La cistectomia subtotale causa anche l'aumento della risposta immunitaria per Shh (*Sonic Hedgehog Homolog* : proteina coinvolta nella morfogenesi), Gli-1 (*Glioma-associated oncogene homolog 1* : fattore di trascrizione), BMP-4 (*Bone morphogenetic protein 4* : proteina coinvolta nella morfogenesi).

Questo studio di Follow up dimostra che i primi stadi di rigenerazione funzionale della vescica sono caratterizzati da cambiamenti tempo-dipendenti nella localizzazione della popolazione cellulare nei diversi strati parietali e nell'espressione di alcune proteine segnale mantenute intatte durante lo sviluppo evolutivo.

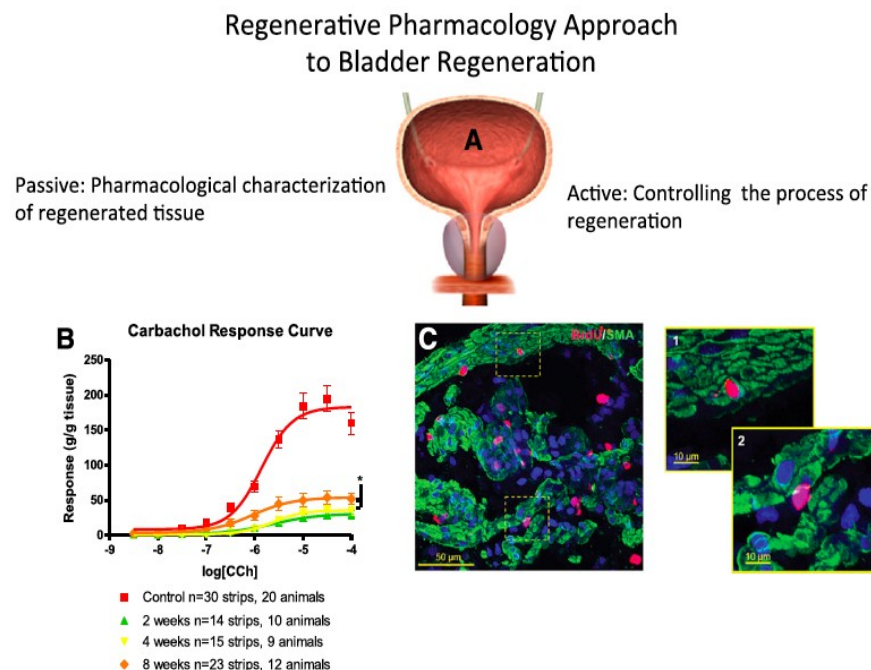


Figura 7B,C. Rigenerazione della vescica. 7B: Risposta contrattile del muscolo liscio alla stimolazione colinergica (Carbacolo) 2, 4, 8 settimane dopo intervento di cistectomia subtotale. Dal grafico concentrazione-risposta si evidenzia la tempo-dipendenza della contrattilità muscolare. 7C: Marcatura con Bromodeossiuiridina (BrdU) per studiare la risposta proliferativa della vescica. Le immagini risalgono a 7 giorni dopo l'intervento di cistectomia in topi femmina. (Christ et al., 2013, The Pharmacology of Regenerative Medicine. Pharmacol Rev 65:1091-1133, July 2013)

La teoria che il tessuto vescicale rigenerato sia simile a quello di partenza è stata proposta da Frederiksen et al. (2004): quindici settimane dopo una cistectomia in topi femmina si è reciso del tessuto trasversale dal corpo della vescica e si è esposto a stimoli contrattili, prendendo come punto di riferimento la zona del trigono vescicale. Si sono utilizzati antagonisti e agonisti dei recettori muscarinici e dei recettori alfa-1-adrenergici (in ordine: Scopolamina e Prazosina; Carbacolo e Fenilefrina) per esaminare il ruolo di ciascun recettore nel processo contrattile, tramite stimolazione con campi elettrici.

I ricercatori sono giunti alla conclusione che il tessuto muscolare della vescica neoformato risulta ben innervato e possiede proprietà farmacologiche simili al tessuto sopratrigonale da cui è stato sviluppato.

Kanematsu et al. (2003) hanno sperimentato la capacità della BAM (*Bladder acellular matrix*) di costituire un'impalcatura per trasportare il fattore di crescita bFGF (*Basic fibroblast growth factor*) e hanno riscontrato un buon rilascio di questo fattore da parte dell'impalcatura, sia in vitro che in vivo.

Inoltre, dopo quattro settimane dall'intervento di cistectomia in un roditore, il fattore bFGF promuove l'angiogenesi ed inibisce le restenosi con un meccanismo dose-dipendente.

Uno studio diverso ha valutato invece gli effetti di VEGF (*Vascular endothelial growth factor*): gli esami istologici e funzionali dimostrano che il rilascio di VEGF, sempre per mezzo di impalcature BAM, ha effetti positivi precoci sui meccanismi rigenerativi (Youssif et al., 2005).

Infatti, il fattore VEGF esogeno, quattro settimane dopo l'intervento, aumenta la capacità contenitiva della vescica, diminuisce il volume residuo, aumenta l'angiogenesi e la quantità di tessuto muscolare liscio.

Inoltre, aggiungendo a VEGF il fattore di crescita NGF (*Nerve growth factor*), otto settimane dopo l'intervento, il numero di cellule positive a VEGF risulta superiore, suggerendo l'ipotesi che VEGF e NGF possiedono un effetto sinergico nel promuovere la riparazione della vescica.

Questa teoria ha ricevuto conferme da Kikuno et al. (2009) dopo la valutazione dei risultati post-operatori in topi con midollo spinale danneggiato:

Otto settimane dopo il danneggiamento, topi femmina del genere *Sprague-Dawley* sono

stati sottoposti ad un intervento di cistoplastica tramite utilizzo di un'impalcatura BAM senza fattori di crescita, o con NGF e VEGF, sia da soli che in associazione.

Otto settimane dopo l'intervento i roditori che avevano ricevuto entrambi i fattori di crescita dimostrano una capacità contenitiva della vescica ed una compliance migliori, una quantità di muscolo liscio e di tessuto nervoso molto maggiore rispetto a tutti gli altri gruppi di roditori.

Mettendo insieme i risultati di questi studi si può dedurre che VEGF e NGF contribuiscono fortemente al recupero strutturale e funzionale della vescica.

Per concludere, in un modello suino di intervento di cistoplastica, Loai et al. (2010) hanno incorporato a VEGF l' Acido Ialuronico dimostrando che la loro associazione comporta, dieci settimane dopo l'intervento, una migliore epitelializzazione, neovascolarizzazione e rigenerazione del tessuto muscolare liscio della vescica.

IV. Farmacologia Rigenerativa e Cellule Staminali

Le terapie rigenerative devono quasi inevitabilmente riguardare cellule Staminali e Progenitrici (Nirmalanadhan and Sittampalam., 2009).

Nonostante siamo ancora in una fase iniziale, le cellule staminali vengono attualmente utilizzate in diversi test clinici per il trattamento di alcune malattie (Trounson et al., 2011).

Le cellule staminali (*Figura 8*) sono cellule caratterizzate da una capacità di auto-rinnovamento (*self-renewal*) e di differenziazione in sottotipi cellulari diversi.

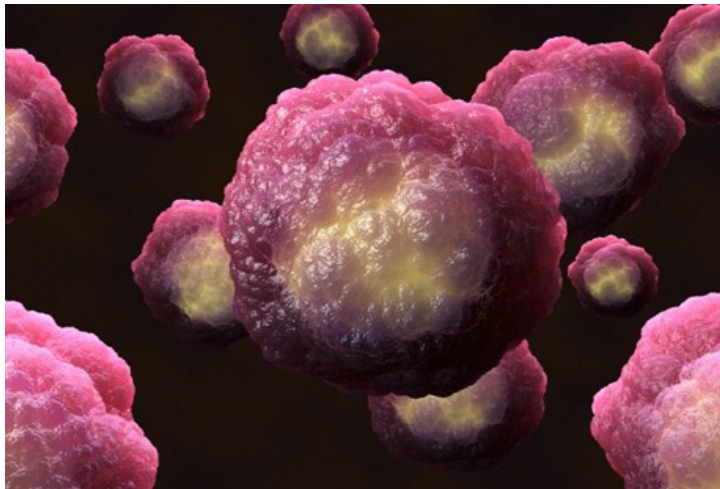


Figura 8. Rappresentazione artistica di Cellule Staminali.

(David Mack/Science Photo Library/Corbis)

Tramite divisione cellulare asimmetrica (“mitosi bivalente”), la cellula staminale dà origine a due cellule figlie: la prima è identica a se stessa, scarsamente proliferante, ed in grado di mantenere invariato il pool di cellule staminali di quel tessuto; la seconda è caratterizzata dalla capacità di maturazione progressiva verso cellule fenotipicamente e funzionalmente sempre più specializzate.

In questo modo il numero di cellule staminali rimane invariato (prima popolazione cellulare), mentre la seconda popolazione si divide ulteriormente per dare origine ad un elevato numero di cellule figlie, mature e differenziate, che compongono i tessuti (Cao et al., 2004).

Si distinguono cinque classi di Cellule Staminali:

1) Cellule Staminali Totipotenti: Cellule in grado di differenziarsi in ogni tessuto

embrionale ed extraembrionale, derivanti da embrioni allo stadio di 4-8 cellule, dopo 1-3 giorni dalla fecondazione.

2) Cellule Staminali Pluripotenti: Cellule Staminali embrionali (Cellule ES).

Queste crescono in laboratorio a partire da un piccolo gruppo di cellule, trovate in embrioni di 5-6 giorni di vita. A questo stadio l'embrione viene chiamato "blastocisti", una sfera costituita da circa 100-150 cellule.

Le cellule staminali pluripotenti (*Figura 9*) sono in grado di differenziarsi in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma).

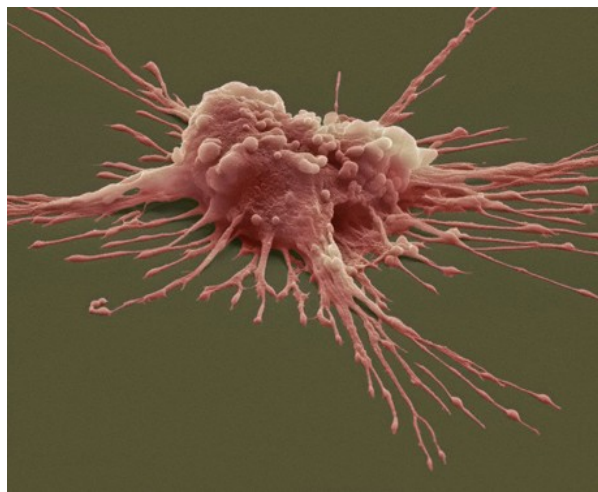


Figura 9. Immagine al microscopio elettronico di cellula staminale pluripotente.

(Steve Gschmeissner/Science Photo Library/Corbis)

3) Cellule Staminali Germinali: Cellule staminali pluripotenti che rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi. Se isolate, sono in grado di replicarsi all'infinito mantenendo le loro capacità differenziative pluripotenti, come le cellule ES.

4) Cellule Staminali Multipotenti: Cellule staminali con la capacità di moltiplicarsi, ma non di rinnovarsi in modo illimitato.

Esse si differenziano in tessuti diversi appartenenti però allo stesso foglietto embrionale.

5) Cellule Staminali Unipotenti: Cellule staminali organo-specifiche in grado di differenziarsi esclusivamente nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, dando origine ad una sola linea cellulare.

La restrizione ad una particolare linea cellulare prende il nome di "Impegno cellulare" e

l'acquisizione dei contenuti specifici di tale linea si verifica durante il processo di differenziazione (Smith., 2006; Sheridan and Harris., 2009).

Alcuni fattori di crescita, ormoni e altre molecole segnale possono essere veicolate tramite biomateriali per controllare l'espansione, il destino e la differenziazione di cellule staminali o progenitrici (Furth et al., 2007; Keatch et al., 2012).

Come mostra la *Figura 10*, la Farmacologia Rigenerativa utilizza cellule staminali e progenitrici in cinque modi diversi (Christ et al., 2013):

- A) Espansione in coltura di cellule staminali o progenitrici
- B) Mobilizzazione di cellule staminali o progenitrici da porzioni di tessuto endogeno
- C) Differenziazione a partire da cellule staminali multipotenti/unipotenti in linee cellulari specifiche
- D) Differenziazione a partire da cellule staminali pluripotenti (Cellule ES o iPS) in linee cellulari specifiche
- E) Riprogrammazione genetica e farmacologica per generare cellule staminali pluripotenti indotte (Cellule iPS).

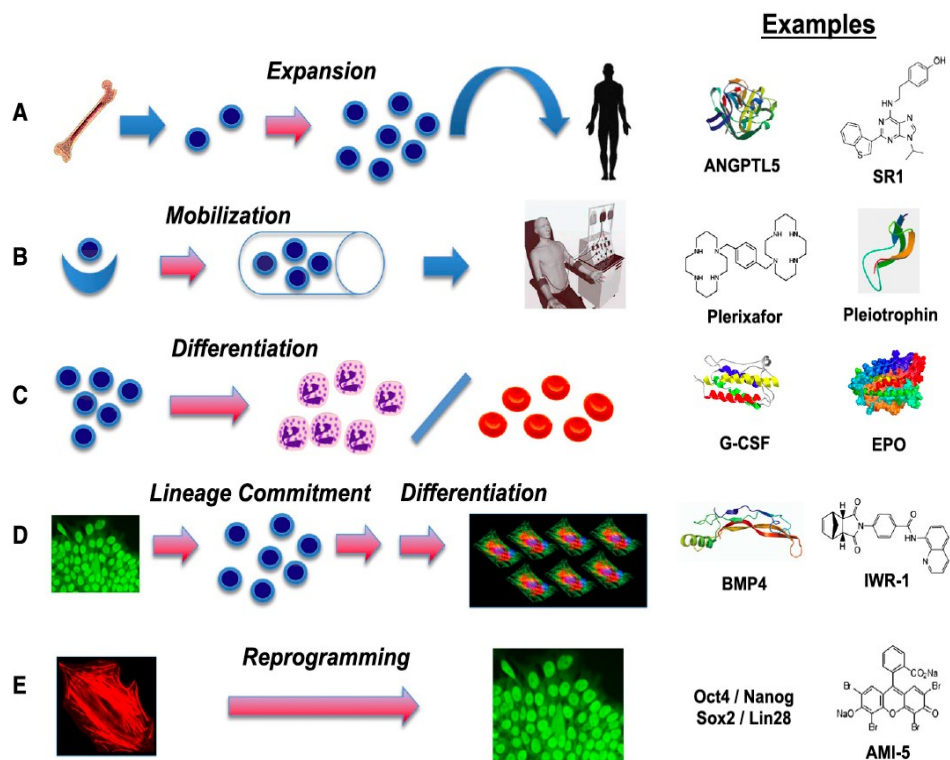


Figura 10. Cinque strategie per utilizzare cellule staminali e progenitrici:

(A) Espansione in coltura di cellule staminali o progenitrici tramite isolamento di cellule staminali ematopoietiche (HSC) e trattamento con fattori di crescita/citochine, tra cui “angiopoietin-like 5” (ANGPTL5) (Drake et al., 2011), o (a destra) per mezzo di SR1 (Boitano et al., 2010).

(B) Plerixafor (Brave et al., 2010) promuove la mobilizzazione delle cellule HSC in associazione con G-CSF. Anche la Pleiotropina di origine ricombinante promuove l'espansione del pool HSC in vivo (Himburg et al., 2010; Istvanffy et al., 2011). (C) Maturazione accelerata dei granulociti, promossa da G-CSF (Frampton et al., 1994). A destra, differenziazione a partire da progenitori eritroidi a globuli rossi per mezzo di eritropoietina (EPO) (Faulds and Sorkin., 1989).

(D) Differenziazione in cardiomiociti a partire da cellule mesenchimali per mezzo di BMP-4 (Evseenko et al., 2010; Hogan., 1996; Kattman et al., 2011; Murry and Keller., 2008). A destra, piccole molecole inibitrici di Wnt/segnale delle beta-catenine, come IWR – 1 (Chen et al., 2009; Willems et al., 2011) guidano la generazione di cardiomiociti a partire dal mesoderma di cellule ES umane. (E) A sinistra, fibroblasti cutanei vengono riprogrammati per la pluripotenza tramite esposizione a quattro fattori di trascrizione, ad esempio, i quattro fattori identificati dal gruppo Thomson: Oct4/ Nanog/ Sox2/ Lin 28 (Yu et al., 2007). A destra, la “piccola molecola” AMI-5 (Yuan et al., 2011b) consente la riprogrammazione in combinazione con il solo fattore Oct4. (Christ et al., 2013: *The Pharmacology of Regenerative Medicine. Pharmacol Rev* 65:1091-1133, July 2013)

A. Espansione in coltura di cellule staminali o progenitrici

Le cellule staminali o progenitrici di tessuti sia fetali che adulti, in grado di proliferare in vitro mantenendo le loro caratteristiche essenziali, sono diverse:

Tra queste vi sono popolazioni di cheratinociti autologhi, condrociti autologhi, cellule staminali del sistema ematopoietico (HSC) e cellule staminali neurali (NSC).

Per molti tipi cellulari l'aggiunta di specifici fattori di crescita in un mezzo privo di siero risulta essenziale per evitare la loro differenziazione prematura (Manfredini et al., 2007).

A questo proposito, alcune sperimentazioni hanno utilizzato una grande varietà di fattori di crescita, citochine e “piccole molecole” per rendere possibile l’espansione intensiva cellulare senza l'eccessiva induzione alla differenziazione e alla perdita della capacità di *self-renewal* (Watts et al., 2011; Walasek et al., 2012; Furth et al., 2013).

In alternativa ai mezzi privi di siero, si può utilizzare del siero umano o animale come fonte diretta di ormoni e di fattori di crescita.

Espansione in coltura di Cheratinociti Autologhi:

L’espansione in vitro di cheratinociti autologhi da piccole aree cutanee ha salvato la vita a due bambini con ustioni di terzo grado molto estese (Green., 2008).

Questo ha portato alla realizzazione di un autoinnesto dell’epidermide espanso in coltura oggi presente in commercio: Epicel (De Bie., 2007).

De Luca et al. (2006) hanno utilizzato EGF (*Epidermal growth factor*) insieme a fattori di crescita forniti da fibroblasti murini per conservare le colture di cheratinociti a lungo termine.

Grazie ai trapianti di cellule epiteliali originarie dalla pelle della cornea, sono arrivati alla conclusione che nell’innesto è presente un adeguato pool di cellule staminali: si può così spiegare questo processo rigenerativo.

Espansione in coltura di Condrociti Autologhi:

Come per i cheratinociti autologhi, sono state espanse in coltura anche popolazioni di

condrociti autologhi.

Questo ha portato all'immissione in commercio di prodotti per le riparazioni della cartilagine (Manfredini et al., 2007).

Espansione in coltura di Cellule Staminali HSC:

Le cellule staminali più utilizzate per l'espansione in coltura sono quelle del sistema ematopoietico (cellule HSC), provenienti dal midollo osseo rosso e dal sangue del cordone ombelicale.

Queste cellule staminali, dopo espansione in coltura, servono da precursori a tutte le cellule sanguigne, inclusi gli eritrociti, i megacariociti e i componenti dell'immunità innata e acquisita (Bryder et al., 2006; Seita and Weissman., 2010).

Possibili applicazioni delle HSC riguardano il trattamento di patologie come la leucemia e l'anemia aplastica.

Tuttavia, occorre specificare che le cellule del midollo osseo dotate di *self-renewal* a lungo termine e in grado di ricostituire completamente il sistema ematopoietico sono rare, soltanto lo 0,02% delle cellule nucleate (Kent et al., 2009; Bonnefoix and Callanan., 2010) e, nonostante la loro notevole capacità proliferativa (Cao et al., 2004; Gazit et al., 2008; Notta et al., 2011), risulta ancora difficile coltivarle mantenendo la loro “staminalità”.

Alcuni fattori di crescita, citochine e “piccole molecole” possono portare ad un'espansione fino a 1000 volte maggiore delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche che continuano ad esprimere il marker di superficie CD34, quindi non differenziate.

Il marker di superficie CD34 è un antigene che identifica tutte le cellule staminali ematopoietiche e le cellule progenitrici del midollo osseo.

Tale antigene risulta assente nei precursori midollari morfologicamente identificabili e nelle cellule circolanti del sangue periferico; per questo motivo il CD34 è considerato un marcatore specifico dello stadio maturativo, ma non di linea differenziata.

Un mezzo di coltura ben definito, contenente un insieme di fattori proteici incluso il fattore **ANGPTL5** (*Angiopoietin-like protein 5*), può aumentare di circa 20 volte l'espansione delle cellule staminali ematopoietiche estratte dal cordone ombelicale

umano (Drake et al., 2011).

Lo stesso obiettivo può essere raggiunto tramite l'utilizzo di una “piccola” molecola purinica, dal nome **SR1** (*StemRegenin 1*) (*Figura 11*) (Boitano et al., 2010), un antagonista dei recettori AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*).

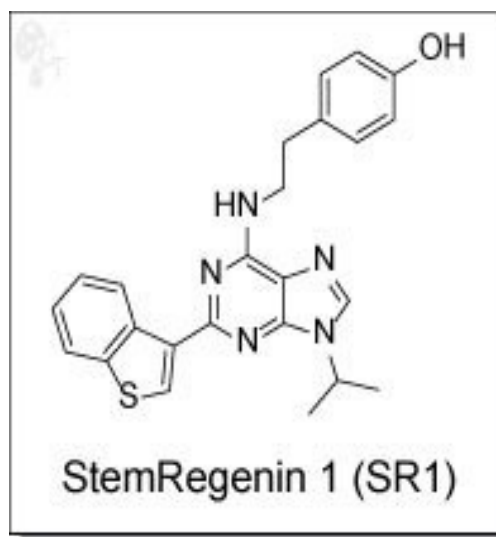


Figura 11. Struttura chimica della molecola SR1 (StemRegenin 1).

Formula chimica C₂₄H₂₃N₅OS . (Cellagentech.com)

Infine, sistemi di coltura sofisticati e automatizzati riducono l’esposizione delle staminali a segnali inibitori paracrini da parte di cellule figlie più differenziate, facilitando l’espansione a lungo termine delle staminali ematopoietiche (Csaszar et al., 2012).

Espansione in Coltura di Cellule Staminali e progenitrici Neurali:

Anche le cellule staminali e progenitrici neurali possono essere espanse in coltura ed essere utilizzate per scopi di Medicina Rigenerativa.

Weiss et al. (1996) hanno scoperto che le cellule staminali possono essere isolate dal sistema nervoso centrale dei mammiferi non solo durante lo sviluppo fetale, ma anche durante la vita adulta.

Le cellule staminali neurali (cellule NSC), se coltivate in mezzi privi di siero contenenti EGF (*Epidermal growth factor*) e bFGF (*Basic Fibroblast growth factor*),

si espandono in aggregati sferici e possono dare origine a neuroni, cellule gliali e oligodendrociti (Gage., 2000; Bergstrom and Forsberg-Nilsson, 2012).

Esse, inoltre, rendono possibile la neurogenesi, che in alcune zone del cervello dura per tutta la vita.

In futuro, queste cellule staminali possono portare allo sviluppo di terapie per patologie neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer, la sclerosi amiotrofica laterale, il morbo di Parkinson, la degenerazione maculare dovuta all'età, danni al midollo spinale e paralisi cerebrale (Feng and Gao, 2012; Glass et al., 2012; Luan et al., 2012; Politis and Lindvall, 2012; Riley et al., 2012; Sandner et al., 2012).

I primi studi di fase I di cellule staminali e progenitrici neurali sono già iniziati:

La StemCell Inc. ha avviato quattro studi clinici su **HuCNS-SC** per la cura della malattia di Batten (un disordine lisosomiale), nonostante gli studi siano stati poi interrotti a causa di un insufficiente numero di pazienti arruolati.

Per HuCNS-SC (*Human central nervous system stem cells for neurological diseases*) si intende una popolazione di cellule staminali purificate che derivano dal sistema nervoso fetale umano e presentano proprietà neuroprotettive.

Queste cellule sopravvivono a lungo termine e migrano nelle strutture profonde del cervello.

Per questi motivi sono state utilizzate in alcuni studi clinici, come nel trattamento della AMD (*Age-Related Macular Degeneration*), NCL (*Neuronal ceroid-lipofuscinoses*), nella malattia di Pelizaeus-Merzbacher e nelle lesioni a carico del midollo spinale.

B. Mobilizzazione di cellule staminali o progenitrici da porzioni di tessuto endogeno

Se dopo la mobilizzazione delle cellule staminali o progenitrici da porzioni di tessuto endogeno queste vengono reclutate nelle zone di tessuto danneggiato, il contributo alla Medicina Rigenerativa può essere davvero elevato (Christ et al., 2013).

Sono stati scoperti alcuni fattori di crescita e citochine in grado di promuovere la proliferazione delle staminali ed il loro rinnovo automatico, sia durante la fase di sviluppo, sia durante il normale turnover tissutale:

- Tra queste molecole vi è il fattore di crescita **SCF** (*stem cell factor*) e altre molecole

che fanno parte di importanti famiglie di fattori implicati in vie di segnalazione coinvolte nello sviluppo, tra cui Wnt, Notch e Hedgehog.

Il recettore per il fattore di crescita delle cellule staminali è il recettore KIT ad attività tirosin-kinasica, codificato dal proto-oncogene c-kit.

Il recettore KIT viene normalmente espresso sulla membrana citoplasmatica delle cellule ematopoietiche e dei mastociti di molte specie animali.

Le glicoproteine Wnt, invece, agiscono come molecole segnale in grado di attivare più vie intracellulari, tra cui la via Wnt/Beta-catenina, importante per la regolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare.

La via di trasduzione del segnale Wnt rappresenta un meccanismo centrale di regolazione dell'espressione genica, altamente conservato nei vertebrati e negli invertebrati (*Figura 12*).

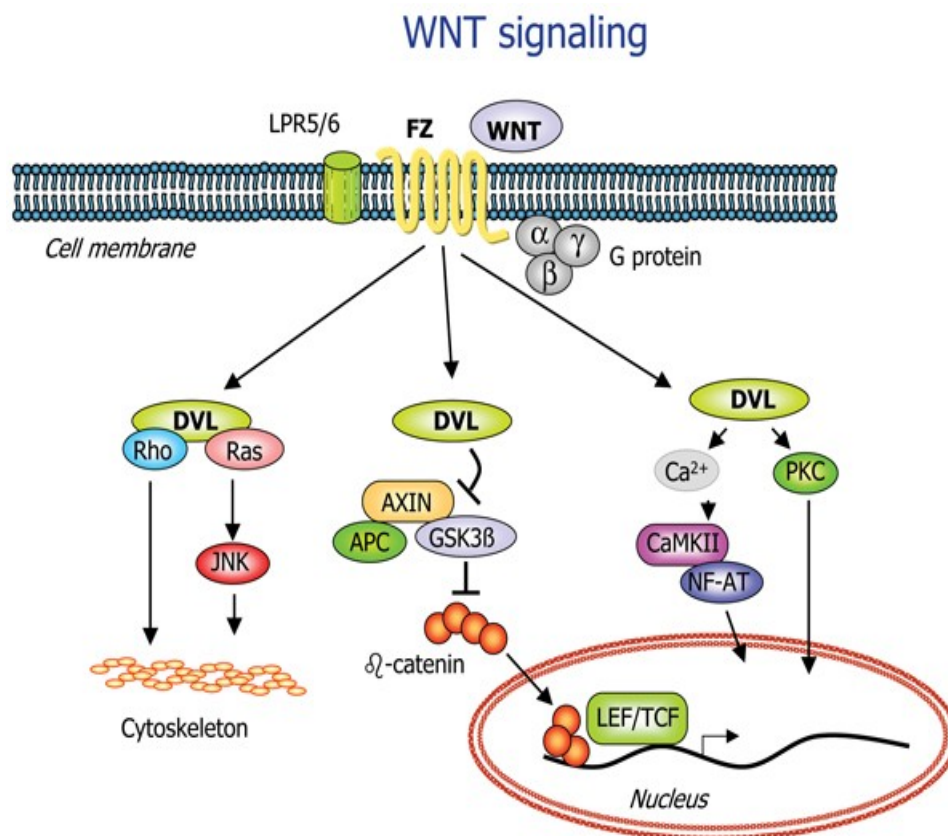


Figura 12. Cascata di segnalazione Wnt.

(Klipp and Liebermeister *BMC Neuroscience* 2006 7(Suppl 1) : S10 doi:10.1186/1471-2202-7-S1-S10)

Il recettore Notch, invece, è un eterodimero transmembrana costituito da un'estesa porzione extracellulare e da una porzione intracellulare più piccola, unite da un legame non covalente calcio dipendente.

Questo è un recettore di natura integrinica, ma oltre ad essere un recettore transmembrana è anche un fattore di trascrizione particolarmente espresso in cellule dotate di potenzialità staminale.

La via Notch è quindi una vera e propria via di segnale, così come la via Hedgehog.

Quest'ultima è coinvolta nei processi di differenziamento, rigenerazione ed omeostasi degli organi del tratto gastrointestinale (Lees et al., 2005).

La cascata Hedgehog comprende tre possibili ligandi: Indian, Sonic e Desert Hedgehog.

- Fattori con bersagli cellulari multipli possono avere effetti farmacologici selettivi, come la **Pleiotropina**, una citochina legante l'eparina che agisce sul recettore proteico Tirosina fosfatasi b/z.

Questa citochina aumenta la crescita delle fibre nervose e può regolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali embrionali (ES) e di altre cellule che derivano dai tre foglietti embrionali (Deuel et al., 2002).

La somministrazione di Pleiotropina di origine ricombinante stimola selettivamente la guarigione del midollo osseo in topi irradiati e aumenta fino a 20 volte le cellule staminali a lungo termine del midollo ematopoietico (Himburg et al., 2010).

- Lo stesso risultato può essere raggiunto tramite rilascio di un fattore pleiotropico in un sito specifico:

La famiglia delle Wnt è in grado di regolare la proliferazione e la differenziazione di molte categorie di cellule staminali e progenitrici, come quelle coinvolte nella formazione delle ossa.

Se si include la proteina Wnt 3 in vescicole liposomiali e si somministrano localmente in topi con difetti scheletrici, questa è in grado di promuovere la rigenerazione del tessuto osseo tramite proliferazione delle cellule progenitrici scheletriche e loro rapida differenziazione in osteoblasti (Minear et al., 2010).

- **G-CSF** (*Granulocyte colony-stimulating factor*) è stato approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) e messo in commercio con i nomi **Filgrastim** e **Lenograstim** (Frampton et al., 1994), poiché in grado di stimolare le cellule HSC a

migrare da zone del midollo osseo per entrare nella circolazione.

Ciò rende possibili i trapianti di cellule staminali del midollo osseo rosso da donatori sani di midollo e, probabilmente, contribuisce anche alla guarigione del tessuto ematopoietico danneggiato.

- Una “piccola” molecola chiamata **Plerixafor** (**Mozobil**; **AMD3100**) (*Figura 13*) ha ricevuto l’autorizzazione all’immissione in commercio sia dal CHMP (*European committee for Medicinal Products for Human Use*) che dalla FDA (*Food and Drug Administration*).

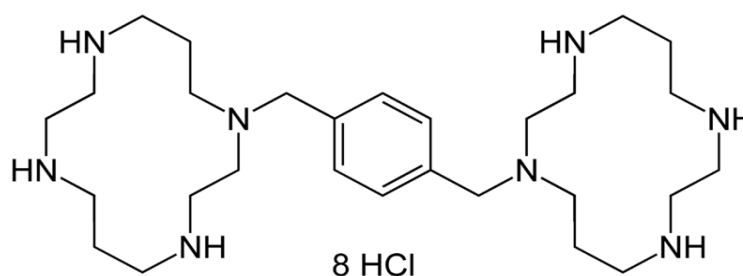


Figura 13. Struttura chimica di Plerixafor (Mozobil).

(*Pharmacorama.com*)

Plerixafor è particolarmente indicato in combinazione con G-CSF per incrementare la mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche al sangue periferico, per la raccolta e il trapianto autologo in pazienti con linfoma e mieloma multiplo con scarsa mobilitazione cellulare (*Compendio Farmaceutico FARMADATI – aggiornato al n.82 del 03.02.2012*).

Il farmaco mobilita le HSC tramite un meccanismo d'azione particolare (*Brave et al., 2010*):

Plerixafor, un derivato del Biciclam, interferisce con l’azione della chemochina SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) come antagonista reversibile sul suo recettore CXCR4.

L’attività farmacologica del Plerixafor è abbastanza specifica da spiazzare le cellule staminali ematopoietiche dalle porzioni del midollo osseo senza causare tossicità eccessiva.

- Il trapianto delle cellule staminali veicolate tramite il torrente circolatorio potrebbe essere migliore incorporando le cellule in un appropriato biomateriale, ad esempio un sistema a struttura definita. Questo biomateriale può essere migliorato con l'aggiunta di

fattori di crescita e di altre componenti della matrice extracellulare in grado di guidare la proliferazione e/o la differenziazione (Turner et al., 2010).

Questa osservazione deriva da una dimostrazione che la veicolazione di farmaci in idrogeli ialuronici migliora moltissimo la ritenzione di cellule staminali epatiche (HpSC) nel fegato, rendendo migliore l'attecchimento, la proliferazione e la vascolarizzazione (Turner et al., 2013).

Innestare le cellule in una matrice idrogelica migliora così la riparazione tissutale e diminuisce il rischio per le cellule veicolate tramite il torrente circolatorio di essere intrappolate; in questo modo le cellule trapiantate possono sopravvivere e proliferare anche in siti distanti.

- Un articolo recente ha descritto un metodo per promuovere la rigenerazione ossea veicolando cellule staminali in un'area danneggiata, in questo caso cellule MSCs, con la co-somministrazione di un farmaco denominato **LLP2A-Ale**:

Le Cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono le cellule precursori degli osteoblasti. Il loro numero diminuisce con l'aumentare dell'età, con conseguente diminuzione dell'osteogenesi e aumento del rischio di osteoporosi.

Il trapianto delle sole MSCs esogene non permette il recupero cellulare della porzione giusta della struttura ossea; è necessario aggiungere un composto che faccia da ponte tra le MSCs e la superficie ossea.

Da una lista di peptidomimetici è stato selezionato il composto LLP2A ed è stato associato all'alendronato (Ale), un bifosfonato che si lega al tessuto osseo.

Il composto ottenuto è stato denominato LLP2A-Ale e, se trapiantato con MSC umane in topi affetti da immunodeficienza, stimola l'adesione e la ritenzione delle MSCs sulla superficie ossea, aumentando la formazione trabecolare e la massa ossea in qualche settimana.

L'alendronato è un farmaco comunemente utilizzato nei pazienti affetti da osteoporosi, ma da solo non risulta efficace alle basse dosi utilizzate in questi studi. Il composto coniugato, invece, è in grado di dirigere le MSCs endogene alla superficie dell'osso e a stimolare l'attività degli osteoblasti.

Il farmaco bifunzionale è in grado di prevenire l'osteopenia (perdita del tessuto osseo con l'invecchiamento) e, in topi femmina, previene la drastica perdita di tessuto osseo causata dalla privazione degli estrogeni dopo ovariectomia (Guan et al., 2012).

C. Differenziazione a partire da cellule staminali multipotenti o unipotenti in linee cellulari specifiche

La somministrazione farmacologica di fattori di crescita e citochine può portare alla differenziazione di cellule staminali multipotenti o unipotenti in linee cellulari specifiche (cellule differenziate).

- I primi esempi commercialmente significativi sono l'**EPO** e il **G-CSF**.

EPO (*Erythropoietin*) ha come bersaglio le cellule precursori degli eritrociti.

La somministrazione di Eritropoietina umana di origine ricombinante promuove la crescita accelerata delle cellule rosse del sangue (Faulds and Sorkin., 1989).

Questa molecola può essere utilizzata nella terapia dell'anemia ed è un noto dopante in grado di migliorare le performance degli atleti.

Il G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*), invece, ha come bersaglio i precursori specifici dei granulociti.

L'iniezione di G-CSF di origine ricombinante promuove la proliferazione accelerata dei granulociti per combattere le infezioni velocizzando la guarigione in casi di neutropenia, ad esempio dopo trattamento con agenti chemioterapici citotossici in pazienti affetti da neoplasie (Frampton et al., 1994).

In entrambi i casi le cellule differenziate hanno un'aspettativa di vita limitata: gli eritrociti umani sopravvivono all'incirca 120 giorni e i granulociti inattivi meno di una settimana.

Inoltre, sia l'EPO che il G-CSF, non alterano in modo permanente l'equilibrio dei compartimenti dei precursori e delle cellule staminali nel midollo osseo, quindi i loro effetti sono solo passeggeri.

- Successivamente, sono stati messi in commercio due membri della grande famiglia delle proteine della morfogenesi ossea (BMPs): **BMP-7** e **BMP-2**.

Le BMPs sono proteine importanti per indurre la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici ossee, incluse le cellule staminali mesenchimali (cellule MSC).

La proteina BMP-7 umana di tipo ricombinante, nota anche come “proteina osteogenica-1” o “eptoterminal-alfa”, veicolata tramite un materiale spugnoso di collagene di tipo 1, ha ricevuto l'approvazione dalla FDA per i trattamenti delle fratture

delle ossa lunghe che non guariscono spontaneamente (Friedlaender et al., 2001).

La proteina BMP-2 umana di tipo ricombinante, sempre veicolata tramite un materiale spugnoso di collagene di tipo 1, è stata messa in commercio per la terapia di alcune fratture, innesti dell'osso e procedure per la fusione spinale (McKay et al., 2007).

Nonostante questi farmaci siano molto utilizzati (solo negli Stati Uniti il mercato dei prodotti a base di BMPs raggiunge all'incirca un miliardo di dollari l'anno [Burks and Nair., 2010]), alcune importanti pubblicazioni hanno recentemente fatto notare i rischi di complicazioni in seguito alla terapia con BMPs, come la produzione di tessuto osseo ectopico (Carragee et al., 2011; Mirza., 2011).

Infatti, la proteina BMP-2 è ottima nell'indurre rapidamente e irreversibilmente la neo-formazione di cartilagine e di tessuto osseo, ma può anche causare la formazione di tessuto osseo ectopico indesiderato (Noel et al., 2004).

Anche solo migliorare la veicolazione delle BMPs potrebbe portare dei benefici significativi: le BMPs possono essere veicolate localmente per mezzo di cellule geneticamente modificate (Kimelman-Bleich et al., 2011) e l'utilizzo di materiali osteoconduttori può ridurre gli effetti collaterali.

A questo proposito è stato selezionato un nuovo biomateriale osteoconduttore da una lista di poli-beta-aminoesteri biodegradabili (Brey et al., 2010; Brey et al., 2011).

- Sempre in campo ortopedico, il fattore di crescita **NELL-1** (*NEL-like molecule-1*) può essere somministrato da solo o in associazione con BMP-7 o BMP-2.

NELL-1 promuove la rigenerazione ossea e contemporaneamente blocca la differenziazione competitiva in adipociti (Zhang et al., 2010; Zou et al., 2011; James et al., 2012; Zhu et al., 2011).

Esso, aumenta la formazione ossea in un gran numero di modelli di riparazione in vivo (Li et al., 2011; Siu et al., 2011; Zhang et al., 2011; Zhu et al., 2011).

- Anche i composti che amplificano il segnale delle proteine Wnt possono essere molto importanti per la Farmacologia Rigenerativa ortopedica:

Il fattore **Wnt3a**, pur essendo una proteina ad ampia attività, inglobato in liposomi e poi rilasciato localmente, induce la rigenerazione specifica dell'osso senza la formazione di tessuto osseo ectopico (Minear et al., 2010).

La somministrazione della proteina Wnt3a umana di tipo ricombinante determina la migrazione delle cellule staminali e progenitrici alle aree danneggiate nel periostio e alla

cavità del midollo osseo.

In questo campo, oltre alle “piccole molecole” agoniste del segnale Wnt (Gwak et al., 2012), si possono utilizzare anche “piccole molecole” antagoniste degli inibitori endogeni delle Wnt (Agholme and Aspenberg., 2011).

D. Differenziazione a partire da cellule staminali pluripotenti (Cellule ES o iPS) in linee cellulari specifiche

Le cellule staminali embrionali (cellule ES) sono particolarmente versatili perché sono cellule pluripotenti, in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari presenti nell'organismo.

Le cellule staminali pluripotenti indotte (cellule iPS) sono cellule somatiche riprogrammate in cui si induce la pluripotenza tramite processi di induzione.

Sono molte le prove a testimoniare il fatto che le cellule ES o iPS possano dare origine ad una grande varietà di cellule differenziate (specializzate) ed i meccanismi molecolari alla base di questi processi iniziano ad essere noti (Atkinson et al., 2013).

La differenziazione a partire da una cellula staminale pluripotente in una cellula differenziata richiede una serie di passaggi che corrispondono a delle vere e proprie pietre miliari nella morfogenesi complessa dei tessuti e degli organi maturi (Christ et al., 2013).

L'approccio migliore è quello sequenziale:

Per prima cosa bisogna indurre le cellule pluripotenti a differenziarsi in uno dei tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma) (Murry and Keller., 2008); successivamente, occorre identificare un mix di citochine e fattori di crescita necessari per promuovere ognuna delle fasi sequenziali verso il tipo cellulare maturo desiderato.

Tuttavia, i limiti sono ancora molti:

- Per molte linee cellulari la differenziazione risulta incompleta o inefficace;
- I processi embrionali e fetali che normalmente avvengono in alcune settimane non possono essere ricreati perfettamente in laboratorio;
- Durante il processo di differenziamento cellulare possono verificarsi fallimenti nel raggiungere un normale fenotipo adulto, quindi le progenie differenziate possono

risultare parzialmente immature.

E' da sottolineare soprattutto il terzo punto.

Difatti, il team Baetge (2008) ha scoperto che, per generare cellule beta-pancreatiche a partire da cellule ES umane, dopo l'impianto in topi immunodeficienti, le progenie devono essere lasciate maturare per più di tre mesi (Kroon et al., 2008).

Osservazioni simili riguardano gli epatociti che derivano da cellule staminali umane pluripotenti (Snykers et al., 2009; DeLaForest et al., 2011).

Confronti analitici tra le cellule epatocito-simili ottenute dalle staminali ES umane con le autentiche cellule progenitrici del fegato hanno rilevato alcune differenze sostanziali (Funakoshi et al., 2011): tre settimane dopo la differenziazione in coltura di laboratorio, le cellule ES differenziate somigliano di più agli epatociti fetali umani di meno di 20 settimane di gestazione.

Uno studio recente (Patterson et al., 2012) ha analizzato il processo di differenziazione in linee cellulari multiple rappresentanti tutti e tre i foglietti embrionali e, in nessun caso, la progenie derivante dalle ES e dalle iPS risulta identica alle cellule mature del tessuto corrispondente. Le cellule differenziate continuano ad esprimere un sottoinsieme di geni presente all'inizio dello sviluppo embrionale (LIN28A, LIN28B, DPPA4) e mostrano le caratteristiche cellulari delle prime sei settimane di sviluppo fetale.

Nonostante i risultati rinforzino il valore e l'importanza delle cellule ES e iPS, l'immatunità della progenie è un fattore limitante per la loro applicazione nella Farmacologia Rigenerativa.

E. Riprogrammazione genetica e farmacologica per generare cellule staminali pluripotenti indotte (Cellule iPS)

Dagli esperimenti di John Bertrand Gurdon sulle cellule staminali pluripotenti indotte (cellule iPS), i cui studi sono stati premiati con il premio Nobel condiviso con Shinya Yamanaka nel 2012, sappiamo che il nucleo di una cellula di vertebrato differenziata (cellula somatica) può essere riprogrammato ad uno stadio iniziale, simile a quello delle fasi precoci dello sviluppo embrionale.

Fù così clonato il primo vertebrato, un anfibio della specie *Xenopus laevis* (Gurdon et al., 2003).

Gurdon ha scoperto che, quando un nucleo viene trapiantato da una cellula dell'epitelio intestinale nel citoplasma di una cellula uovo anucleata, può svilupparsi un clone vitale di girino, dimostrando che la cellula somatica possiede un genoma intatto.

Yamanaka e Blau (2010) hanno scoperto che l'espressione di quattro fattori di trascrizione, noti come “fattori di pluripotenza” o ”fattori riprogrammanti”, contenuti in cellule embrionali, sono sufficienti per riprogrammare cellule somatiche differenziate ad uno stadio ES-simile, quindi pluripotenti indotte (iPS).

Lo stesso gruppo di ricercatori e quello di Thomson (2007) hanno confermato che la riprogrammazione di cellule umane può ripristinare lo stadio di pluripotenza (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Queste scoperte hanno un'importanza enorme nel campo della Farmacologia

Rigenerativa: Le cellule iPS umane possono condurre alla creazione di terapie cellulari paziente-specifiche per qualsiasi linea cellulare e la perfetta istocompatibilità potrebbe evitare l'utilizzo di qualsiasi immunosoppressore (Fairchild., 2009).

Quest'ultima ipotesi è stata sostenuta da alcuni studi che hanno utilizzato tessuti bovini clonati con tecniche di SCNT (*somatic cell nuclear transfer*) (Lanza et al., 2002), ma successivamente è stata messa in dubbio da alcuni dati sperimentali ottenuti da cellule iPS murine (Zhao et al., 2011).

La conclusione è questa: In pazienti con infezioni croniche, come epatiti o virus dell'immunodeficienza, le cellule devono essere munite di elementi genetici che proteggono da eventuali virus (Kamata et al., 2010; Rahman et al., 2011) e, in caso di disordini genetici, le mutazioni devono essere corrette prima di riportare le cellule nel paziente (Xu et al., 2009; Kazuki et al., 2010; Khan et al., 2010; Howden et al., 2011; Wong and Chiu., 2011).

Questo concetto può risultare più chiaro portando l'esempio di un paziente diabetico:

Egli può donare una piccola porzione di pelle, capello o sangue, per la riprogrammazione a cellule iPS; queste vengono espanse in coltura, indotte a differenziarsi in cellule pancreatiche di tipo beta e impiantate nel paziente per sostituire le sue cellule che producono insulina; nel paziente diabetico di tipo I, in aggiunta, si devono adottare delle precauzioni per contrastare l'attacco autoimmune che ha portato alla distruzione delle sue cellule beta-pancreatiche.

Alcune cellule differenziate possono essere riprogrammate a cellule iPS tramite

esposizione a quattro fattori di trascrizione: nelle prime sperimentazioni venivano veicolati quattro specifici geni ai fibroblasti per ristabilire lo stadio di pluripotenza (OCT-4/ SOX-2/ KLF-4/ C-MYC oppure OCT-4/ SOX-2/ NANOG/ LIN-28) (Yu et al. , 2007).

Tuttavia, nel corso del processo di riprogrammazione si osserva che quasi tutte le cellule trattate si bloccano, senza riuscire a portare a termine la riprogrammazione stessa.

Un gruppo di ricerca del Weizmann Institute a Rehovot, in Israele, ha scoperto che è una singola proteina a frenare la riprogrammazione delle cellule adulte in cellule iPS, la proteina MBD3.

Sopprimendo l'espressione di questa proteina, l'efficacia del processo di riprogrammazione aumenta dall'1% al 90-100% e le quattro settimane necessarie al completamento del processo si riducono ad appena 8 giorni.

La MBD3 ha la funzione di reprimere la trascrizione delle proteine e, a differenza delle altre proteine dell'organismo, non viene prodotta in cellule specifiche, in momenti specifici, ma viene sintetizzata in ogni cellula del corpo e in ogni fase di sviluppo, eccetto i primi tre giorni dopo il concepimento, ovvero il periodo in cui l'embrione è composto solamente da cellule staminali totipotenti (Rais et al., 2013).

Secondo Rais et al. (2013), la procedura classica (senza l'inibizione di MBD3) è inefficiente perchè i quattro fattori di riprogrammazione attivano la proteina MBD3 inducendola a sopprimere l'espressione dei geni che i fattori di riprogrammazione tentano di riattivare per riprogrammare le cellule allo stadio di pluripotenza.

Il confronto tra i risultati del processo di riprogrammazione classico con quello nuovo, dopo 6 giorni di incubazione, sono mostrati in *Figura 14*:

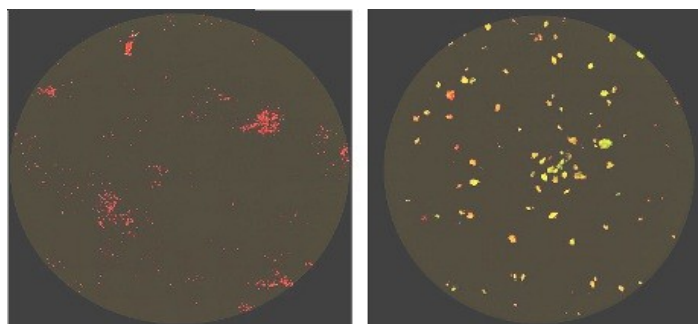


Figura 14. Confronto tra i risultati del processo di riprogrammazione classico/nuovo dopo 6 giorni di incubazione: A sinistra il metodo classico, a destra quello nuovo. In rosso le cellule che non si sono differenziate, in giallo quelle divenute pluripotenti.

(Cortesia J. Hanna / Weizmann Institute)

Uno studio sui topi geneticamente modificati ha dimostrato che la riprogrammazione delle cellule staminali adulte in cellule iPS può essere effettuata anche in vivo, evitando di prelevarle dall'organismo, trattarle in provetta per poi trapiantarle nuovamente nell'organismo di partenza (Abad et al., 2013).

Le cellule staminali ottenute in vivo non sono solo pluripotenti, ma addirittura totipotenti.

Questa caratteristica le rende ancora più simili alle cellule staminali embrionali di quanto non lo siano le iPS prodotte in vitro.

A differenza delle staminali indotte con la tecnica in provetta, quelle ottenute in vivo, sono in grado di produrre il tessuto necessario al nutrimento dell'embrione in fase di crescita, il trofoblasto, ovvero la popolazione cellulare che da origine alla placenta (*Figura 15*).

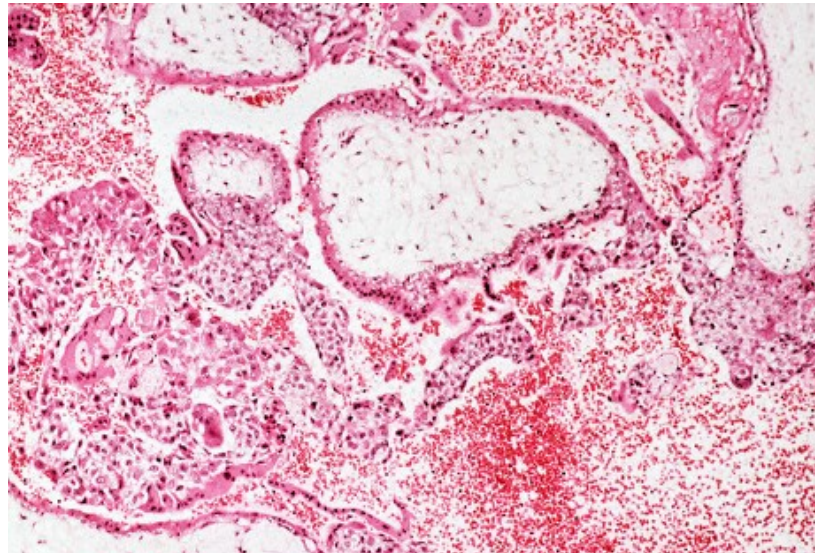


Figura 15. Trofoblasto prodotto dalle staminali ottenute in vivo.

(Source/Corbis)

Grazie ai risultati ottenuti in questi studi, è ragionevole affermare che le cellule iPS rappresentano uno strumento ideale per la sperimentazione di future terapie cellulari rigenerative paziente-specifiche.

In merito alle tecniche di riprogrammazione delle cellule somatiche allo stadio di pluripotenza, vale la pena citare due articoli molto recenti, pubblicati il 30 Gennaio 2014 su “Nature” da Haruko Obokata e colleghi del Centro Riken per la Biologia dello sviluppo di Kobe, in Giappone.

Obokata e Colleghi riferiscono i risultati di un nuovo metodo di riprogrammazione che prende il nome di “Riprogrammazione STAP”, ovvero il processo di “acquisizione di pluripotenza innescata dallo stimolo” (*Stimulus-triggered acquisition of pluripotency*).

Il gruppo di ricercatori ha utilizzato una proteina *reporter*, che emette fluorescenza quando si attiva un gene associato alla pluripotenza, per monitorare una coltura di globuli bianchi sottoposti ad uno stimolo ben definito, come l'esposizione ad una soluzione con basso pH.

Dopo un breve periodo, i globuli bianchi attivano il gene *reporter* di pluripotenza e presentano marker genetici tipici delle cellule embrionali.

Le cellule raccolte ed analizzate sono state denominate cellule STAP e possono dare origine, insieme ad altre cellule embrionali, a chimere di topo.

Le chimere (*Figura 16*) sono topi composti sia da cellule originate dall'embrione sia da cellule STAP.

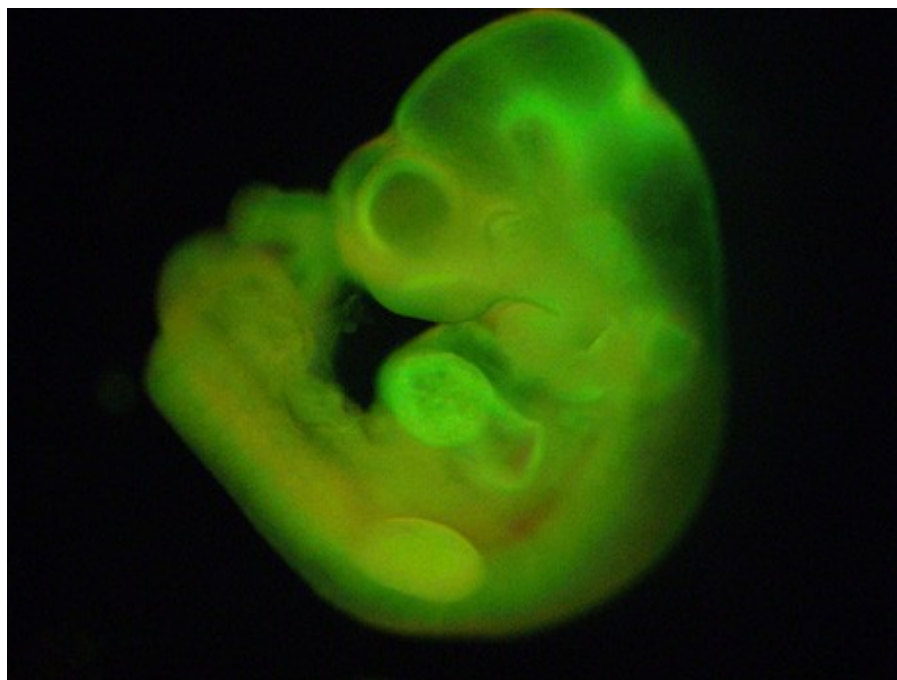


Figura 16. Feto di chimera.
(*Cortesia Haruko Obokata*)

Prima di questo studio si riteneva che la produzione di chimere fosse un'esclusiva delle cellule staminali ES ed iPS, da cui le cellule STAP differiscono per due importanti caratteristiche:

- Non presentano la capacità di *self-renewal*;
- Possono sopravvivere in coltura solo per pochi giorni.

Nel primo articolo pubblicato su Nature, gli autori dimostrano che trasferendo le cellule STAP nelle stesse condizioni di coltura utilizzate per le staminali pluripotenti, le STAP iniziano a proliferare ed acquisiscono le caratteristiche strutturali e i marker diagnostici delle cellule staminali embrionali.

Sembra quasi che le cellule STAP siano delle cellule intermedie riprogrammate in modo parziale (Obokata et al., 2014a).

Nel secondo articolo, si analizzano le chimere originate dalle STAP ed emerge la capacità di queste cellule di colonizzare gli strati extraembrionali dei trofoblasti, caratteristica che si osserva solo raramente nelle chimere prodotte a partire da ES ed iPS (Obokata et al., 2014b).

Queste recenti scoperte pongono l'attenzione sulle ampie potenzialità di utilizzo delle cellule STAP nel contesto della medicina rigenerativa, anche perchè il processo di riprogrammazione STAP, a differenza della riprogrammazione iPS, non richiede alcuna manipolazione del nucleo, né l'utilizzo di fattori di trascrizione.

Al momento, resta comunque da inquadrare le cellule STAP nel contesto delle conoscenze sulle cellule staminali e, a tal proposito, Obokata e colleghi avanzano tre ipotesi:

- Lo stato STAP rappresenta lo stadio dello sviluppo che precede la segregazione delle linee cellulari embrionali da quelle extraembrionali;
- Le STAP sono un misto di cellule predisposte per il differenziamento verso la linea cellulare embrionale o, viceversa, verso quella extraembrionale;
- Le STAP sono cellule sintetiche indifferenziate in cui, in particolari circostanze ambientali, si attivano i geni per il differenziamento cellulare.

V. Possibili Farmaci futuri: “Piccole molecole” Riprogrammanti

L'obiettivo della Farmacologia Rigenerativa è quello di ottenere cellule pluripotenti che assomiglino più da vicino alle cellule delle prime fasi embrionali.

L'attenzione si è quindi focalizzata sul potenziale riprogrammante di alcune “piccole molecole”.

Questi potenziali farmaci possono rimpiazzare alcuni o perfino tutti i fattori di trascrizione attualmente utilizzati e sembrano in grado di rendere la riprogrammazione più efficiente, completa, accurata e sicura rispetto ai normali fattori di trascrizione riprogrammanti (Shi et al., 2008; Ichida et al., 2009; Lyssiotis et al., 2009; Despons and Ding., 2010; Wang et al., 2011b).

- Tra le “piccole molecole” riprogrammanti sono inclusi composti che influenzano target noti per la regolazione epigenetica, come inibitori dell'Istone-deacetilasi, Istone-metiltransferasi, Istone-demetilasi ed inibitori della DNA metiltransferasi (Sidhu., 2011; Yuan et al., 2011a; Choi and Nam., 2012).

- L'utilizzo di una “piccola molecola” denominata **AMI-5** (inibitrice dell'Arginina metiltransferasi) insieme ad un inibitore del fattore di crescita TGF-beta (*Transforming growth factor beta*), rende possibile la riprogrammazione farmacologica allo stadio di pluripotenza utilizzando OCT-4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) come singolo fattore genetico (Yuan et al., 2011b).

OCT-4 è una proteina presente nelle cellule pluripotenti ed è coinvolta nell'auto-rinnovamento delle cellule embrionali indifferenziate.

- Possono contribuire alla riprogrammazione farmacologica anche alcuni composti che influenzano determinate vie di segnalazione delle cellule, come inibitori della proteina Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase*), inibitori della proteina MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) ed inibitori della proteina GSK3-beta (*Glycogen synthase kinase 3 beta*) (Efe et al., 2011).

La proteina Src è una tirosina chinasi appartenente ad una sottofamiglia di nove proteine chinasi molto simili tra loro.

Essa ed i suoi omologhi contengono una corta regione N-terminale che si lega covalentemente ad un acido grasso fortemente idrofobico.

La via di segnalazione Src, come mostra la *Figura 17*, svolge un ruolo importante nel

controllo del comportamento cellulare: induce la mitosi dei fattori di crescita, promuove le fasi G1 ed S del ciclo cellulare, stimola la migrazione e l'adesione cellulare.

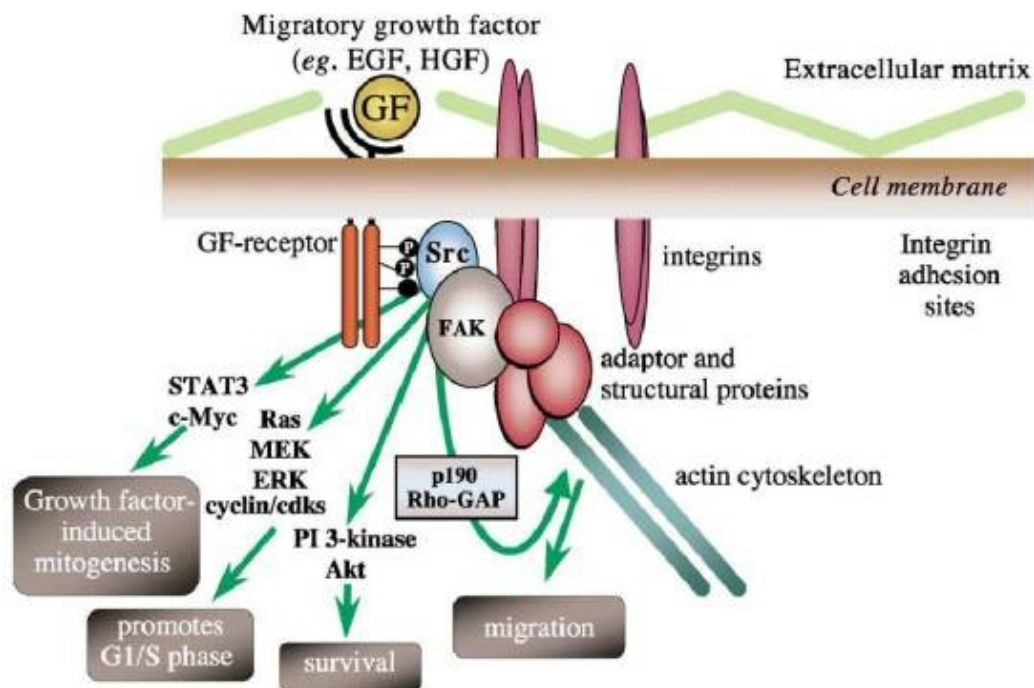


Figura 17. Cascata di segnalazione Src.

(*Biochim Biophys Acta* 1602(2), M. Frame, *Src in Cancer*, 114-130, 2002)

Per proteina MEK (in realtà MEK1 e MEK2) si intende una serin-treonin-chinasi a specificità doppia, che fosforila la tirosina ed i residui di treonina delle chinasi ERK 1 ed ERK 2.

La proteina MEK appartiene alla cascata di segnalazione Ras-Raf-MEK-ERK, illustrata in *Figura 18*, importante per la crescita e la trasformazione cellulare, i cambiamenti morfologici e la regolazione del ciclo cellulare.

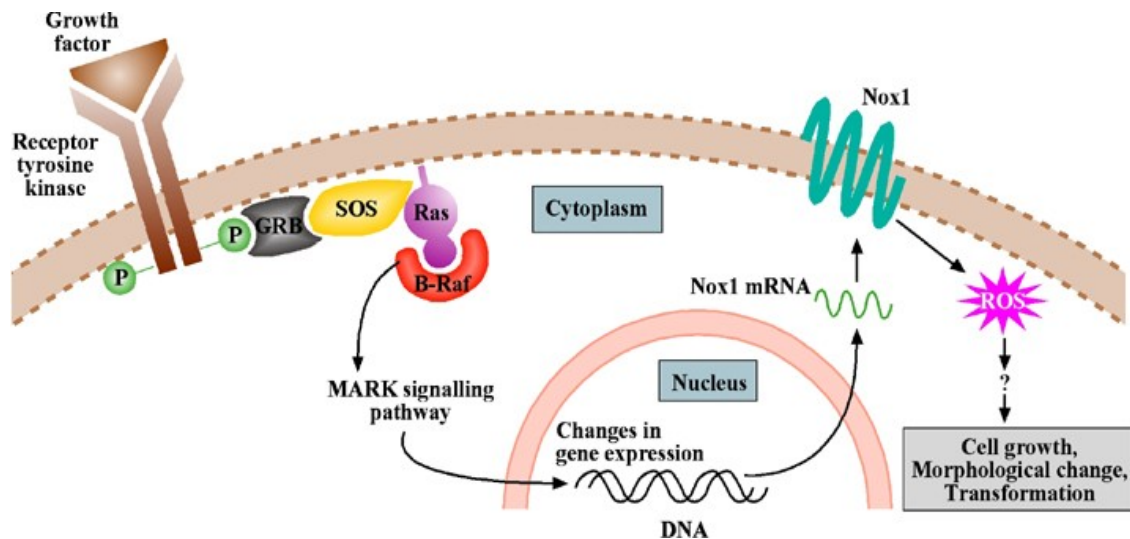


Figura 18. Cascata di segnalazione Ras-Raf-MEK-ERK:

La forma attivata di Ras (Ras-GTP) attiva la cascata Raf1- Mek1/2-Erk1/2.

La cascata Ras-Raf-MEK-ERK gioca un ruolo centrale nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare.

(Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy, Marta Izquierdo)

La proteina GSK3-beta, invece, gioca un ruolo importante nella cascata di segnalazione Wnt/beta-catenina.

Questa proteina viene reclutata per fosforilare dei residui di serina e treonina (serina 33/37, treonina 41/45) sulla beta-catenina funzionando da regolatore negativo del pathway (Rubinfeld et al., 1996).

Queste fosforilazioni consentono il riconoscimento della beta-catenina da parte di alcune proteine che mediano la sua degradazione a livello del proteosoma, come la proteina Beta-TRCP (*beta-Transducin repeat containing protein*) (Kitagawa et al., 1999; Winston et al., 1999).

Il pathway della proteina GSK3-beta è illustrato in Figura 19:

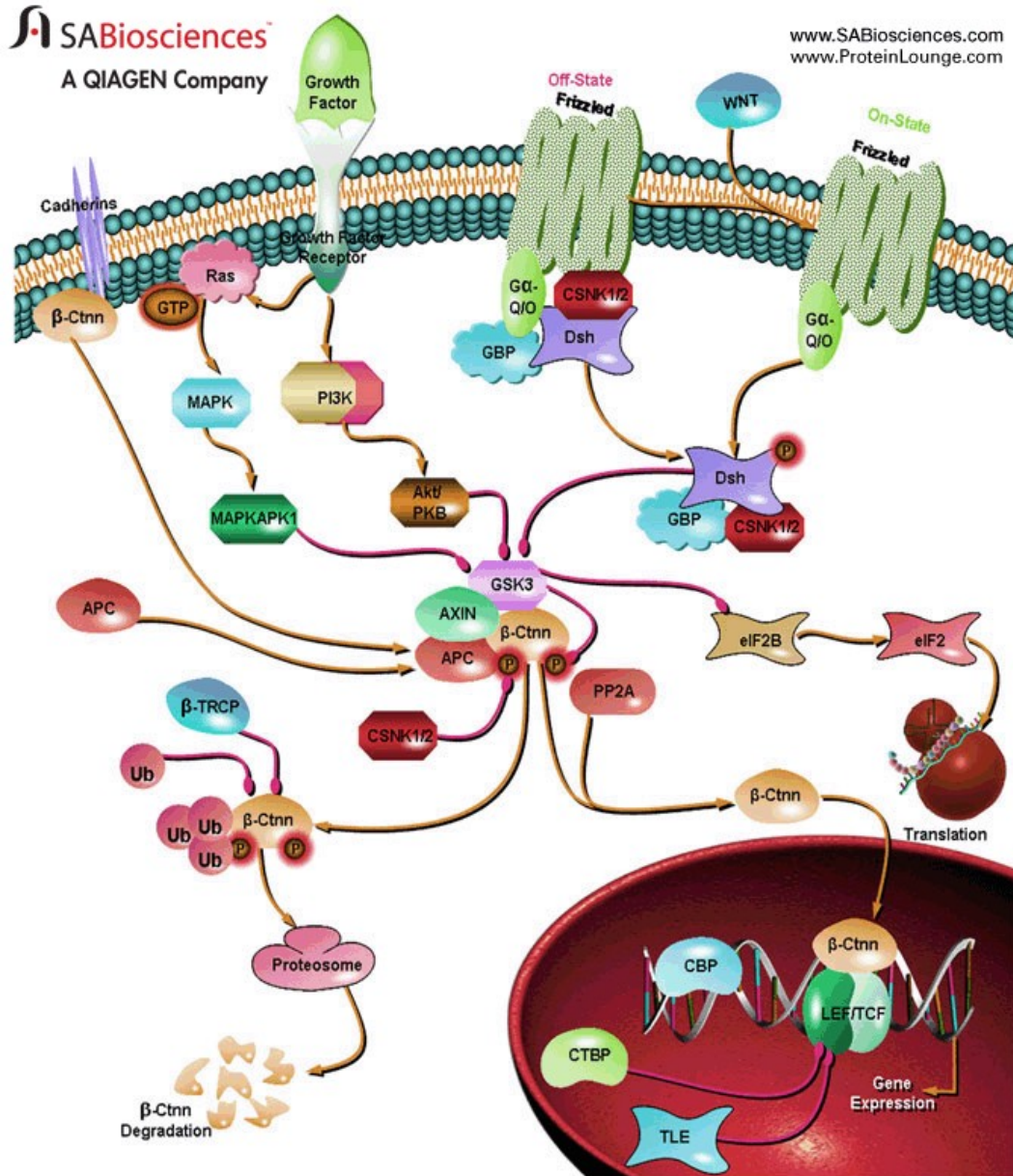


Figura 19. Via di segnalazione del GSK3-beta.

(SABiosciences.com)

In particolare, un potente inibitore della proteina GSK3beta, dal nome **CHIR99021**, è in grado di attivare fortemente le vie di segnalazione che coinvolgono le proteine segnale Wnt.

Per questo motivo CHIR99021 (Figura 20) ha fornito utili risultati nella cura del morbo di Parkinson e nel campo delle patologie cardiovascolari.

Difatti, la “piccola molecola” permette il differenziamento delle cellule del

mesencefalo, generate da cellule iPS, nei neuroni dopaminergici che degenerano nel morbo di Parkinson.

Questi neuroni sopravvivono e funzionano bene se innestati nel cervello di alcuni modelli animali, di cui i più importanti sono i primati non umani Parkinsoniani (*Parkinsonian Nonhuman Primates*) (Kriks et al., 2011).

Nel campo delle patologie cardiovascolari, invece, la stimolazione delle proteine segnale Wnt-Beta contribuisce alla formazione del mesoderma e alla differenziazione di cellule ES e iPS in cardiomiociti.

La stimolazione del segnale Wnt-Beta si verifica tramite inibizione dell'enzima GSK3 beta, di conseguenza, CHIR99021 promuove il differenziamento di cellule ES e iPS in cardiomiociti (Lian et al., 2012).

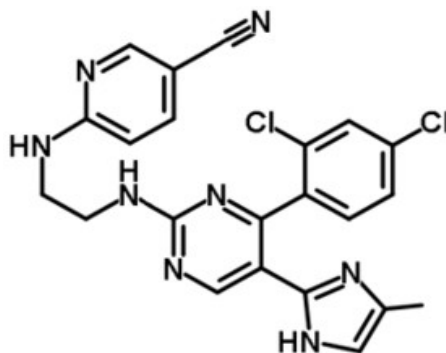


Figura 20. Struttura chimica della molecola CHIR99021: 6- [[2- [[4- (2, 4- dichlorophenyl)- 5- (5- methyl- 1H- imidazol- 2- yl)- 2 pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]- 3- pyridinecarbonitrile. Formula chimica: C₂₂H₁₈Cl₂N₈. (Stemgent. Com)

- L'attenzione si è poi focalizzata su alcune molecole in grado di facilitare la conservazione delle cellule pluripotenti, in modo da semplificarne la coltivazione su larga scala. In particolare, si può prevenire la morte per apoptosi delle cellule ES ed iPS differenziate per mezzo di inibitori della ROCK (*Rho-associated protein kinase*). Rho è un regolatore della forma e del movimento cellulare che agisce tramite la modulazione del citoscheletro (Watanabe et al., 2007; Harb et al., 2008; Koyanagi et al., 2008) ed è fondamentale per la crescita cellulare, l'adesione, la migrazione, il metabolismo ed il meccanismo contrattile (Riento and Ridley., 2003). Questa proteina, inoltre, attiva la cascata di segnalazione delle caspasi innescando l'apoptosi, il suicidio cellulare.

Di norma, subito dopo il differenziamento completo delle cellule ES ed iPS in singole

linee cellulari, si induce immediatamente la loro apoptosi; in questo senso, i ROCK inibitori specifici, come **Y-27632** (Uehata et al., 1997; Ishizaki et al., 2000) e **HA-1077** (**Fasudil**) (Asano et al., 1989) hanno suscitato parecchio interesse consentendo alle cellule staminali pluripotenti indotte, una volta differenziate, di sfuggire all'apoptosi. Il primo, un derivato piridinico, è stato utilizzato in svariate applicazioni di ricerca sulle cellule staminali per promuovere la loro espansione, crioconservazione, trasferimento genico, induzione alla differenziazione e selezione cellulare (*Figura 21*).

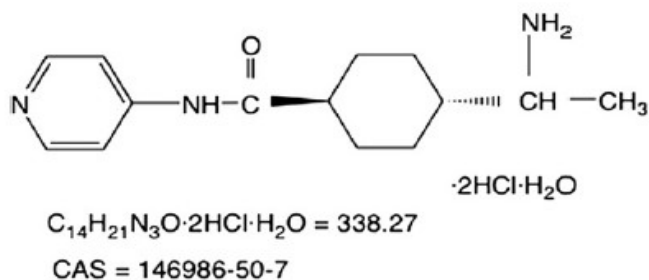
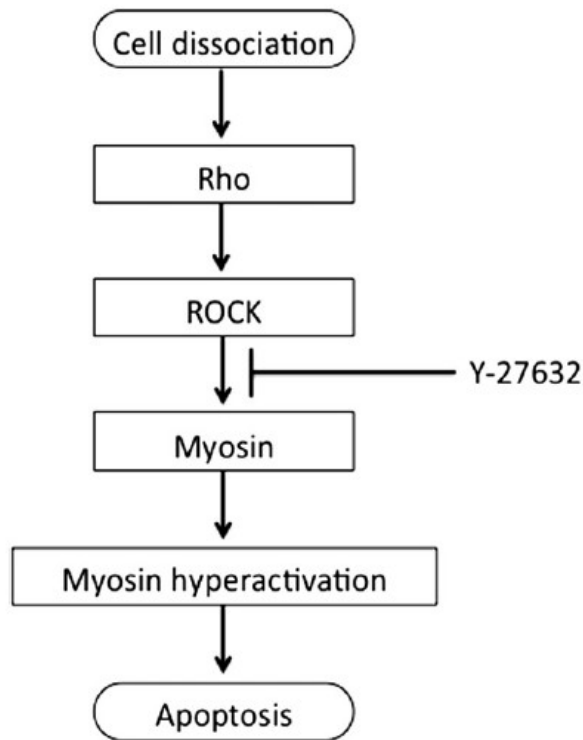


Figura 21. Struttura chimica di Y-27632: [(R)-(1R,2R)-trans-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamidedihydrochloride monohydrate]. (Kurosawa et al., 2012:Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent cells)

Come mostra la *Figura 22*, l' apoptosi delle cellule ES è causata dalla iperattivazione ROCK-dipendente della miosina:

Nelle cellule ES separate, la perdita di E-caderina, una molecola che media l'adesione tra le cellule epiteliali, attiva immediatamente questo sistema a cascata di segnalazione Rho/ROCK/Miosina, causando l'iperattivazione della miosina ed, infine, l'apoptosi (Ohgushi and Sasai., 2011).

Y-27632 antagonizza l'azione della ROCK sulla miosina, quindi blocca la cascata di segnalazione evitando l'apoptosi delle cellule differenziate.



*Figura 22. Meccanismo d'azione di Y-27632 e cascata di segnalazione Rho/ROCK/Miosina.
(Kurosawa et al., 2012: Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells)*

Chen et al. (2010) hanno suggerito che la contrazione actina-miosina sia un meccanismo importante per promuovere la morte delle cellule ES dissociate e, interrompendo questo processo, la sopravvivenza cellulare può essere decisamente migliorata.

Quando viene fosforilata la catena leggera della miosina (MLC) si attiva la contrazione actina-miosina: questo fenomeno è inversamente proporzionale alla concentrazione di Y-27632.

In conclusione, l'inibizione della ROCK riduce la fosforilazione della MLC e, di conseguenza, l'inibizione della contrazione actina-miosina aumenta la sopravvivenza, l'efficienza e la produzione su larga scala delle cellule embrionali staminali.

- Un effetto ancora più diretto sulla pluripotenza è esercitato dalla “piccola molecola” **EHNA** (*Figura 23*) e da alcuni suoi analoghi di sintesi.

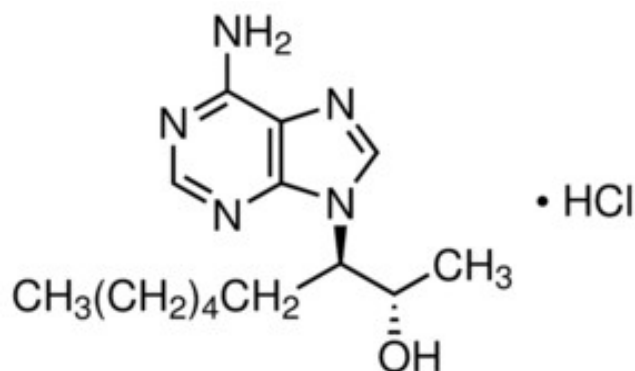


Figura 23. Struttura chimica del composto EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine).
(Sigmaaldrich.com)

Questo composto rende possibile la crescita a lungo termine delle cellule ES umane bloccando la differenziazione e, se rimossa, permette la rapida riacquisizione del potenziale di differenziazione (Burton et al., 2010a).

EHNA presenta una duplice attività:

Essa inibisce la PDE2 (Phosphodiesterase 2) e l'enzima ADA (Adenosine deaminase), ma altri inibitori selettivi di questi enzimi non hanno lo stesso effetto biologico sulle cellule pluripotenti.

Questo suggerisce la presenza di un bersaglio molecolare ancora da determinare (Burton et al., 2010b).

Difatti, è stato dimostrato che l'inibizione del differenziamento cellulare da parte di EHNA non è dovuta né all'attività inibitoria sull'enzima PDE2, né a quella sull'enzima ADA.

Questa “piccola molecola”, inoltre, può sostituire il fattore di crescita bFGF esogeno, spesso utilizzato per conservare le cellule staminali pluripotenti umane.

Difatti, è stato scoperto un modo per bloccare la differenziazione spontanea delle cellule ES, senza la presenza di citochine esogene, con il solo utilizzo di EHNA:

Le cellule ES in presenza di EHNA, per più di dieci passaggi, non hanno mostrato alcuna riduzione di marcatori propri dello stato indifferenziato (NANOG/OCT-4/SSEA-4), analogamente a quanto succede in presenza del fattore di crescita bFGF. Ciò dimostra che questo composto mantiene intatta l'espressione dei marcatori di pluripotenza nelle cellule staminali embrionali umane, anche in assenza di bFGF esogeno.

EHNA inibisce il processo di differenziazione spontanea in modo reversibile, poiché, dopo la sua rimozione, le cellule ES riprendono immediatamente a differenziarsi.

EHNA agisce inoltre da forte bloccante del differenziamento neuronale.

Dall'analisi della struttura chimica di questo composto è stato definito il gruppo farmacoforo: la porzione Adenina-mimetica avente come sostituito sull'azoto in posizione 9 una lunga catena idrofobica.

Sono stati sintetizzati alcuni analoghi con attività comparabile a quella dell'EHNA e la loro capacità di bloccare il differenziamento delle cellule ES umane li rende utili per la manipolazione di queste cellule (Burton et al., 2010b) (*Figura 24*).

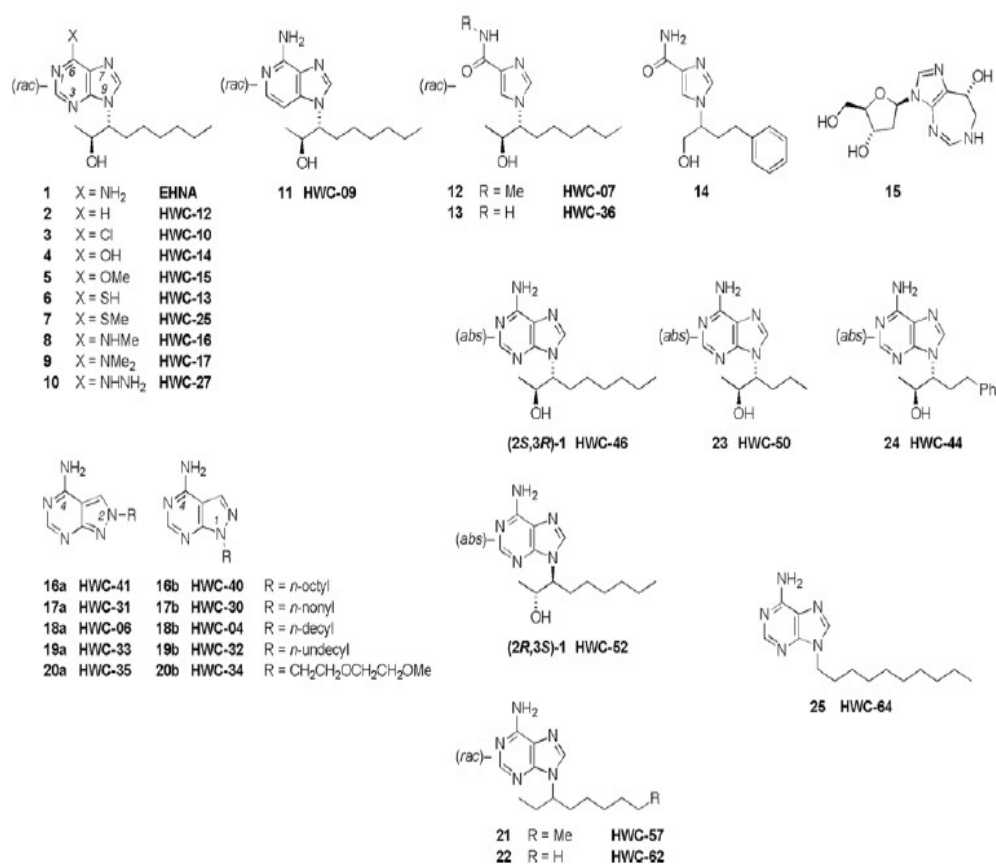


Figura 24. Struttura chimica della molecola EHNA e dei suoi analoghi di sintesi:

Gli analoghi sintetici presentano il gruppo farmacoforo Adenina-mimetico sostituito sull'atomo di Azoto da una lunga catena idrofobica.

(Burton et al., 2010: EHNA blocks differentiation and maintains the expression of Pluripotency markers in human embryonic stem cells)

VI. Farmacologia Rigenerativa e Morbo di Parkinson

Il Morbo di Parkinson è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da disordini del movimento e dell'equilibrio.

Il nome è legato a James Parkinson, un farmacista chirurgo Londinese del XIX secolo, che per primo descrisse gran parte dei sintomi in un famoso libretto: "Trattato sulla paralisi agitante".

Il Morbo di Parkinson è una malattia lenta ma progressiva, che colpisce entrambi i sessi. L'età media di esordio è intorno ai 58-60 anni, ma circa il 5% dei pazienti può presentare un esordio giovanile tra i 21 ed i 40 anni.

La durata della fase preclinica (periodo di tempo che intercorre tra l'inizio della degenerazione neuronale e l'esordio dei sintomi motori) non è nota, ma alcuni studi la datano intorno a 5 anni.

Le cause della malattia non sono ancora chiare, ma sappiamo che ci sono molteplici elementi che concorrono al suo sviluppo, in particolare hanno un ruolo fondamentale alcuni processi patologici come l'infiammazione, le disfunzioni mitocondriali, lo stress ossidativo, i meccanismi pro-apoptotici e l'accumulo di proteine tossiche (Moore et al., 2005; Shulman et al., 2011).

Una delle alterazioni maggiori nel morbo di Parkinson consiste nella progressiva degenerazione e perdita dei neuroni dopaminergici della via nigro-striatale (Dauer and Przedborski., 2003; Lees et al., 2009; Shulman et al., 2011).

Come conseguenza, la produzione di dopamina cala consistentemente e quando si manifestano i primi sintomi la perdita cellulare è di oltre il 60%.

Come mostra la *Figura 25*, le strutture coinvolte nel Morbo di Parkinson si trovano nelle aree profonde del cervello e le modificazioni nell'organizzazione funzionale dei circuiti dei gangli basali porta al tipico quadro patologico del Morbo di Parkinson (Moore et al., 2005).

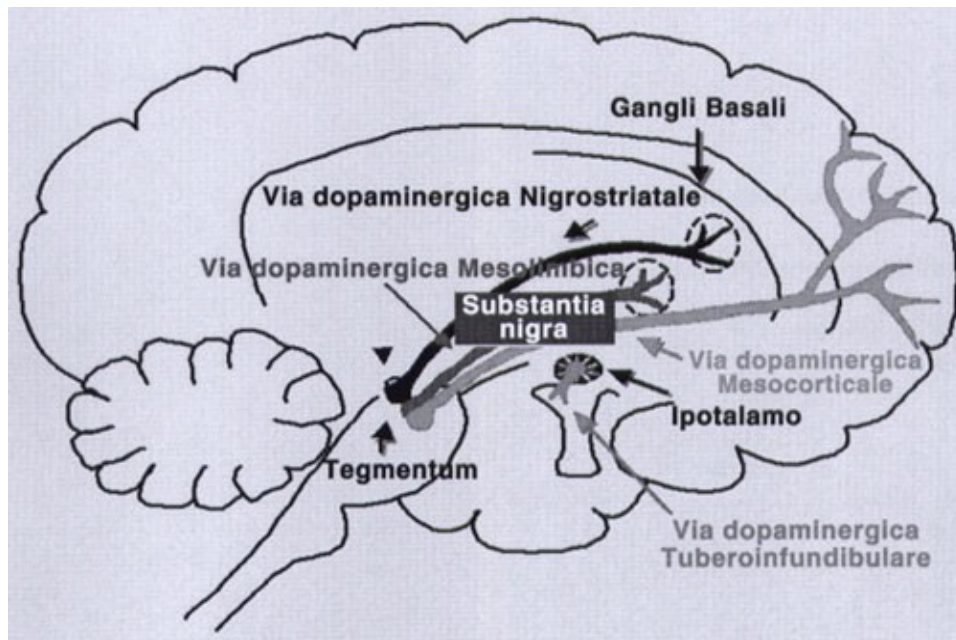


Figura 25. Le vie centrali che interessano il morbo di Parkinson:

Dalla substantia nigra le fibre arrivano fino allo striato (Putamen + Caudato).

La via Nigro-striatale si impoverisce e ne consegue uno squilibrio anche nelle altre vie.

(Lidow MS, et al. TIPS 1998;19:136-40)

Ad oggi, i trattamenti per il Morbo di Parkinson si focalizzano sull'alleviamento dei sintomi, soprattutto per mezzo di terapie dopamino-sostitutive, terapie sistemiche e non personalizzate.

In molti casi non si stimolano selettivamente i gangli della base, di conseguenza si ha la produzione indiscriminata di dopamina e gli effetti collaterali indesiderati possono essere gravi (Hickey and Stacy., 2011).

L'approccio sintomatico della Farmacologia tradizionale presenta quindi numerosi limiti (Lees et al., 2009; Hickey and Stacy., 2011) ed è qui che interviene la Farmacologia Rigenerativa, tramite terapia con cellule staminali o terapia genica.

Terapia a base di Cellule Staminali:

Le terapie a base di cellule staminali sono di due tipi e, in entrambi i casi, le cellule sono utilizzate come veicoli per rilasciare gli agenti terapeutici.

La prima terapia a base di staminali incrementa i livelli di dopamina nel corpo striato

sostituendo le cellule dopaminergiche perse con cellule staminali esogene trapiantate.

In questo modo le cellule staminali sono la fonte diretta di dopamina.

La seconda terapia, invece, ha come obiettivo la neuroprotezione e la neurorigenerazione:

Le cellule impiantate sono veicoli di agenti neuroprotettivi in grado di preservare i neuroni vitali.

Nel secondo caso la Farmacologia mantiene, ripristina o rigenera la fonte cellulare endogena di dopamina in modo indiretto (Christ et al., 2013).

Le cellule staminali studiate nei modelli sia umani che animali con Morbo di Parkinson comprendono le cellule staminali embrionali (ES) (Freed et al., 2001; Kim et al., 2002; Lindvall and Kokaia, 2009), le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) (Wernig et al., 2008), le cellule staminali neurali adulte e fetali (NSC) (Hermann et al., 2006; Schwarz et al., 2006), le cellule staminali mesenchimali (MSCs) (Hellmann et al., 2006; Cova et al., 2010) ed infine, le cellule staminali del liquido amniotico (AFS) (Donaldson et al., 2009).

Tuttavia, al momento, nessuno studio ha ottenuto risultati soddisfacenti riguardo la differenziazione delle MSCs e delle AFS in neuroni dopaminergici.

Un'interessante applicazione di Farmacologia Rigenerativa prevede che alcuni progenitori neurali, generati da cellule iPS, siano indotti a differenziarsi nei neuroni dopaminergici che degenerano nel Morbo di Parkinson. Il composto **CHIR99021** può essere usato per queste applicazioni di Farmacologia Rigenerativa a base di Cellule Staminali.

Tuttavia, un grande ostacolo che si è presentato nel corso delle sperimentazioni è l'immunogenicità, ovvero la possibilità che le cellule staminali trapiantate inneschino una grave risposta immunitaria nell'ospite, fino al rigetto delle stesse cellule staminali.

Asuka Morizane, del CiRA (*Center for iPS Cell Research and Application*) dell'Università di Kyoto, ha effettuato uno studio su alcuni esemplari di macaco cinomologo (*Macaca Fascicularis*) e ha stabilito che il trapianto di cellule staminali è ben tollerato solo quando è di tipo autologo, cioè quando le cellule provengono dallo stesso organismo in cui sono state trapiantate.

Morizane et al. (2013) hanno effettuato un confronto diretto tra trapianto autologo e trapianto allogenico (non autologo) di neuroni dopaminergici (ottenuti in vitro a

partire da iPS) senza l'utilizzo di immunosoppressori.

Gli esemplari di macaco sono rimasti in osservazione per tre mesi e i risultati dello studio sono schematizzati in *Figura 26*: le scimmie sottoposte a trapianto allogenico hanno mostrato una reazione immunitaria molto evidente; quelle sottoposte a trapianto autologo, invece, non hanno manifestato nessuna risposta immunitaria.

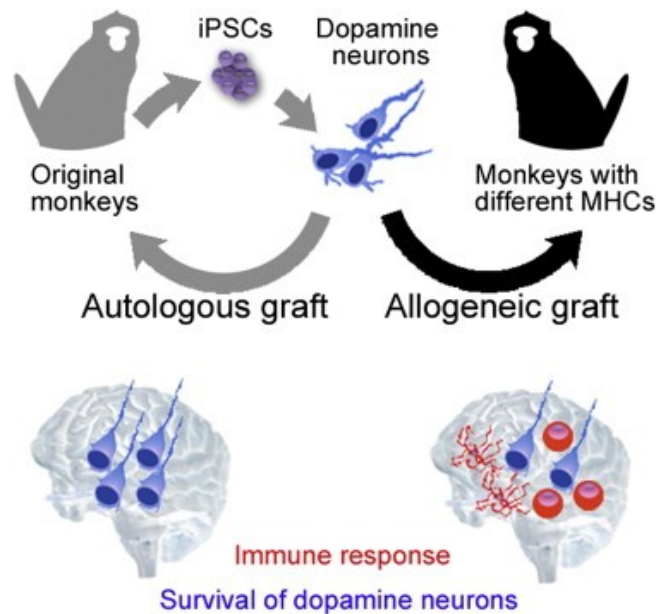


Figura 26. Confronto tra trapianto autologo e allogenico di neuroni dopaminergici in esemplari di macaco cinomologo: Risposta immunitaria (in rosso) e sopravvivenza dei neuroni dopaminergici (in blu).

(Morizane et al., 2013 Stem Cell Reports, Volume 1, Issue 4, 283-292, 26 September 2013)

Terapia Genica:

La terapia genica rappresenta una strategia alternativa per ripristinare la capacità del cervello di rilasciare dopamina o agenti neuroprotettivi/neurorigenerativi nel nucleo striato.

Geni che codificano per enzimi sintetizzanti la dopamina o geni codificanti per fattori di crescita, molecole antiossidanti o sostanze antiapoptotiche, vengono impacchettati in vettori virali e successivamente impiantati nella zona intrastriatale (Muramatsu et al., 2003).

In particolare, il vettore virale più utilizzato per il suo profilo di sicurezza e per la sua facilità di utilizzo è il vettore AAV (*Adeno-associated virus*) (Ozawa et al., 2000; Bankiewicz et al., 2006), attualmente il più usato nelle sperimentazioni cliniche di fase I e di fase II (Hickey and Stacy., 2011).

L'iniezione intrastriatale di una miscela a tre componenti di TH (*Tyrosine Hydroxylase*), AADC (*Aromatic l-amino acid decarboxylase*) e GTPCH (*GTP Cyclohydrolase I*), per mezzo del vettore AAV in topi con deficit di 6-OHDA (*6-Hydroxydopamine*), stimola la produzione di dopamina per un periodo superiore a 12 mesi dall'intervento (Shen et al., 2000).

Lo stesso gruppo di ricerca ha confermato questi risultati nei modelli di studio su primati affetti da Morbo di Parkinson, in cui l'aumento nella produzione di dopamina è superiore ad un periodo di 10 mesi dall'intervento (Muramatsu et al., 2002).

L'enzima AADC appartiene alla classe delle Liasi e comprende un certo numero di enzimi diversi, tra questi l'enzima Dopa decarbossilasi, che interviene nel processo di sintesi della Dopamina convertendo il suo precursore Levodopa (L-DOPA) in Dopamina stessa.

Molti farmaci tradizionali per la cura del Morbo di Parkinson sono inibitori dell'enzima Dopa decarbossilasi (come la Benserazide) e vengono somministrati in associazione alla L-DOPA, come Madopar (L-DOPA + Benserazide).

Più recentemente, Muramatsu et al. (2010) hanno veicolato il gene codificante per AADC (gene DDC) per mezzo del vettore AAV, tramite iniezione nel putamen di sei pazienti affetti da Morbo di Parkinson.

I risultati sono stati osservati con la tomografia ad emissione di positroni, tramite utilizzo di un marker per AADC:

Sei mesi dopo l'intervento le funzioni motorie sono notevolmente migliorate e l'aumento dell'attività del marker per AADC è rimasto invariato per ben 96 settimane.

Se l'obiettivo è stimolare un processo di neuroprotezione e neurogenerazione, invece, il vettore AAV può veicolare fattori di crescita neurotrofici in grado di aumentare la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici nel mesencefalo, tra questi il fattore GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*) appartenente alla stessa famiglia del fattore di crescita NGF (*Nerve growth factor*) (Lindsay et al., 1991; Lin et al., 1993).

Infatti, l'infusione di GDNF con il vettore AAV in roditori e primati affetti da Morbo di

Parkinson garantisce protezione e rigenerazione nervosa (Kirik et al., 2004; Ramaswamy et al., 2009; Aron and Klein., 2011).

Sostituendo GDNF con il suo analogo naturale, la Neurotutina (NTN), gli effetti protettivi coinvolgono i neuroni dopaminergici della substantia-nigra per un periodo superiore a 6 mesi dal trattamento (Gasmi et al., 2007a,b).

Ad oggi, nonostante i risultati siano particolarmente apprezzabili, non siamo effettivamente in grado di stabilire la definitiva attività neuroprotettiva di GDNF e NTN poiché i loro studi nei pazienti affetti da Morbo di Parkinson sono rimasti inconclusi (Gill et al., 2003; Nutt et al., 2003; Lang et al., 2006; Bartus et al., 2011).

Un ulteriore studio innovativo consiste nella veicolazione del gene che codifica per l'enzima GAD (*Glutamate decarboxylase*) in pazienti di età compresa tra i 30 ed i 75 anni affetti da Morbo di Parkinson progressivo rispondente a trattamento con L-DOPA (LeWitt et al., 2011).

L'enzima GAD catalizza la sintesi di GABA (*Gamma-AminoButyric Acid*) a partire dall'Acido Glutammico.

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio del Sistema Nervoso Centrale e il suo aumento in concentrazione a livello del nucleo subtalamico migliora le funzioni dei gangli basali con notevoli effetti Neuroprotettivi.

VII. Rigenerazione Cardiaca

Il cuore è l'organo principale del sistema cardiocircolatorio, un muscolo cavo grande poco più di un pugno chiuso che spinge il sangue all'interno dei vasi per essere trasportato in ogni distretto dell'organismo.

Il cuore si trova all'interno del torace, nel mediastino, cioè la parte centrale della cavità toracica, compresa tra il polmone destro e quello sinistro.

La sua attività è garantita dal Miocardio (il muscolo del cuore) e dagli stimoli elettrici che originano nel cuore stesso (tessuto di conduzione).

Questo organo origina embriologicamente dal Mesoderma ed è formato da quattro cavità (due atri e due ventricoli) separate da setti e valvole e dalle quali si dipartono e arrivano arterie e vene del circolo polmonare sistemico.

Le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morte in Europa secondo una ricerca epidemiologica promossa dall'Unione Europea nell'ambito del progetto EUROCISS (*European Cardiovascular Indicators Surveillance Set*) per la prevenzione delle malattie del cuore e dei vasi (Azzani et al., 2008).

Il cuore è il primo organo che si differenzia nei vertebrati ed il Turnover del muscolo cardiaco adulto è estremamente limitato.

Le cellule che costituiscono il tessuto muscolare del Miocardio sono i Cardiomiociti.

La grande sfida per la Farmacologia Rigenerativa consiste nel sostituire cardiomiociti danneggiati o morti, con cardiomiociti sani originati da cellule staminali, in grado di pulsare e di salvare la vita a molti pazienti (Gersh et al., 2009; Bartunek et al., 2010).

La possibilità di indurre la pluripotenza nelle cellule somatiche ha aperto la strada alla Medicina rigenerativa cardiovascolare grazie alla successiva differenziazione delle cellule ES ed iPS in cardiomiociti.

Come per le altre linee cellulari, i risultati migliori si ottengono sfruttando un approccio sequenziale (Kattman et al., 2011):

- 1) Induzione del Mesoderma
- 2) Induzione del Mesoderma Cardiaco
- 3) Induzione dei progenitori cardiaci/cardiovascolari
- 4) Induzione dei Cardiomiociti

Tuttavia, ancora una volta, le difficoltà da affrontare sono molte:

- I Cardiomiociti ottenuti sono in grado di pulsare, ma parzialmente immaturi;
- Alcuni passaggi del processo di differenziazione non sono ancora chiari;
- I precursori dei cardiomiociti devono differenziarsi in un numero molto elevato di sottotipi cellulari (Cardiomiociti del ventricolo sinistro, cellule della muscolatura liscia ed endoteliali, cellule del nodo senoatriale e atrioventricolare...).

Ciò nonostante, la Farmacologia Rigenerativa è in fase attiva di sperimentazione e i progressi sono davvero incoraggianti.

Negli ultimi anni la ricerca scientifica sta tentando di realizzare dei vasi sanguigni a partire dalle cellule staminali umane, per sostituirli a quelli danneggiati.

All'Università di Pittsburgh, in Pennsylvania, un gruppo di ricercatori sta studiando la crescita dei vasi sanguigni su intelaiature di materiale polimerico che, dopo aver svolto il compito di supporto, si sciolgono in modo naturale.

Questi vasi hanno fornito risultati incoraggianti in modelli di sperimentazione murini e presto saranno sperimentati sui maiali, animali che presentano caratteristiche ancora più simili all'uomo (Azzani et al., 2008).

Uno studio condotto da Tung-Ying Lu e colleghi del dipartimento di biologia dello sviluppo dell'Università di Pittsburgh utilizza una nuova tecnica di ingegnerizzazione che prevede la coltivazione delle cellule staminali iPS su un'impalcatura costituita da un cuore di ratto “decellularizzato”.

Nello studio si dimostra come le cellule iPS, da cui sono stati derivati i progenitori cardiovascolari multipotenti, possono essere indotte a differenziarsi in tessuto cardiaco funzionale, aprendo la strada alla realizzazione di organi artificiali in grado di sostituire quelli naturali danneggiati.

La tecnica di decellularizzazione consiste nella rimozione della componente cellulare, mantenendo intatta la matrice extracellulare.

Dopo 20 giorni di perfusione sanguigna, le strutture bioartificiali ottenute rispondono ai farmaci utilizzati per stimolare il battito cardiaco, mostrano contrazioni spontanee e caratteristiche elettrofisiologiche tipiche di un cuore naturale (Lu et al., 2013).

Altri risultati sorprendenti derivano, invece, da alcuni studi che dimostrano come determinate citochine, fattori di crescita o “piccole molecole” siano capaci di modulare il processo di sintesi di cardiomiociti a partire da cellule staminali pluripotenti:

- Alcune “piccole molecole” sono in grado di indurre la differenziazione di cellule

staminali totipotent in cardiomiociti, ad esempio i quattro composti diaminopiridinici che prendono il nome di **Cardiogenoli A-B-C-D**.

In particolare, il **Cardiogenolo C** (*Hydrochloride*) induce la formazione di un fenotipo cardiomiocita-simile a partire da cellule staminali pluripotenti generate dai follicoli piliferi murini (Yau et al., 2011).

Il Cardiogenolo C (*Figura 27*), così come la “piccola molecola” **CHIR99021**, deve la sua efficacia alla stimolazione del *pathway* Wnt, in particolare la via Wnt/Beta-catenina.

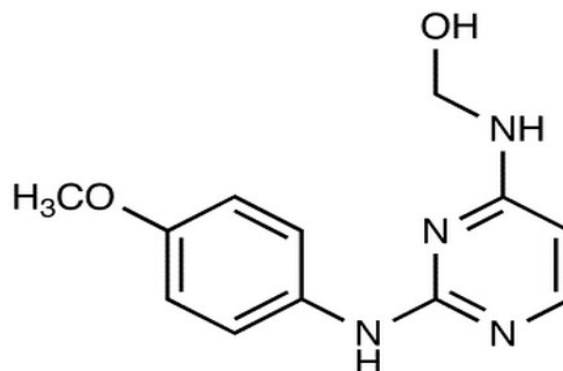


Figura 27. Struttura chimica del Cardiogenolo C:

2-[[2-[(4-Methoxyphenyl)amino]-4-pyrimidinyl]amino]ethanol Hydrochloride.

Formula chimica: C₁₂H₁₅ClN₄O₂.

(trc-canada.com)

Il meccanismo d'azione di questi due composti è apparentemente in contrasto con quello di un'altra “piccola molecola” : **XAV 939** (*Figura 28*)

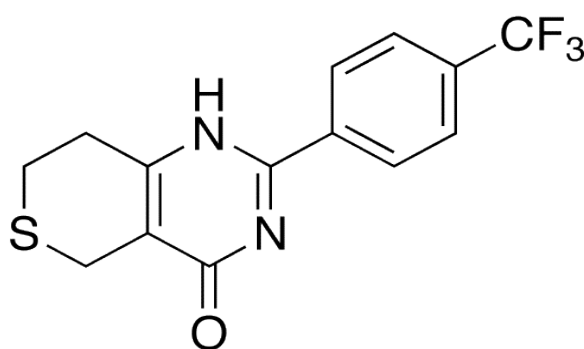


Figura 28. Struttura chimica di XAV 939:

1,5,7,8-Tetrahydro-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-4H-thiopyrano[4,3-d]pyrimidin-4-one; NVP-XAV 939

Formula chimica: C₁₄H₁₁F₃N₂O₂.

(trc-canada.com)

Difatti, XAV 939 aumenta fortemente la produzione di cardiomiociti a partire dalle cellule progenitrici del mesoderma inibendo il segnale Wnt (Wang et al., 2011a), non tramite la sua stimolazione.

Questa incongruenza può essere chiarita grazie alla spiegazione del ruolo bifasico che la cascata di segnalazione Wnt ha nel processo di differenziazione cardiaca:

Inizialmente il segnale Wnt promuove l'induzione del mesoderma, successivamente fa esattamente l'opposto (Paige et al., 2010).

Di conseguenza, per ottenere i giusti risultati, la somministrazione di queste tre molecole deve rispettare delle tempistiche ben precise.

- La “piccola molecola” **62 HIT**, che inibisce il recettore di EGF (*Epidermal growth factor*), aumenta di circa 3 volte la sintesi dei cardiomiociti a partire da cellule ES (Shen et al., 2012a).

Ciò nonostante, altri composti che inibiscono questo recettore non mostrano la stessa attività sulle cellule ES.

Questo suggerisce che il composto 62 HIT sia attivo su un bersaglio molecolare ancora da identificare.

- Lo studio di Chan et al. (2010) dimostra la capacità di FGF-10 (*Fibroblast growth factor 10*) di promuovere la differenziazione di cellule ES in cardiomiociti.

Il gruppo di ricercatori è giunto a questa conclusione utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro lo stesso FGF-10.

- Un ulteriore studio è quello schematizzato in *Figura 29*:

La sovraespressione dei fattori di trascrizione OSKM (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc) determina la differenziazione di una cellula somatica in cardiomiociti, tramite isolamento delle cellule iPS (Takahashi and Yamanaka., 2006).

Nel secondo esempio, la sovraespressione degli stessi fattori, addizionati ad un inibitore della via di segnalazione JAK-STAT (JAKi), determina la riprogrammazione parziale della cellula somatica, senza isolare le cellule iPS, arrestandosi ad uno stadio pre-iPS.

Questo metodo di differenziazione cardiaca è più rapido ed efficiente rispetto al precedente (Efe et al., 2011).

La via di segnalazione JAK-STAT regola le risposte cellulari alle citochine e ai fattori di crescita; tale via svolge un ruolo centrale nella decisione del destino cellulare e nella modulazione dei processi di proliferazione, differenziazione ed apoptosi.

Tramite le proteine JAKs e le proteine STATs si traduce il segnale generato dalle citochine e dai fattori di crescita e, nel nucleo cellulare, si modifica l'espressione genica. Con l'aggiunta dell'inibitore JAKi, si blocca il segnale generato dalle citochine e dai fattori di crescita, quindi ci si arresta ad uno stadio pre-iPS.

Il terzo esempio mostra un metodo di riprogrammazione ancora più diretto, rapido ed efficace rispetto ai precedenti: con la sovraespressione dei fattori di trascrizione cardiaci GATA4/MEF2C/TBX5 nella cellula somatica, si ottengono direttamente dei cardiomiociti, senza entrare nello stadio di pluripotenza.

Grazie a questo protocollo di riprogrammazione diretta, le cellule cardiache murine, diverse dai miociti, possono essere riprogrammate direttamente in vivo a cardiomiociti e non è necessario prelevarle dall'organismo e trattarle in provetta per poi trapiantarle nuovamente nell'organismo di provenienza (Riprogrammazione in vivo) (Srivastava et al., 2012).

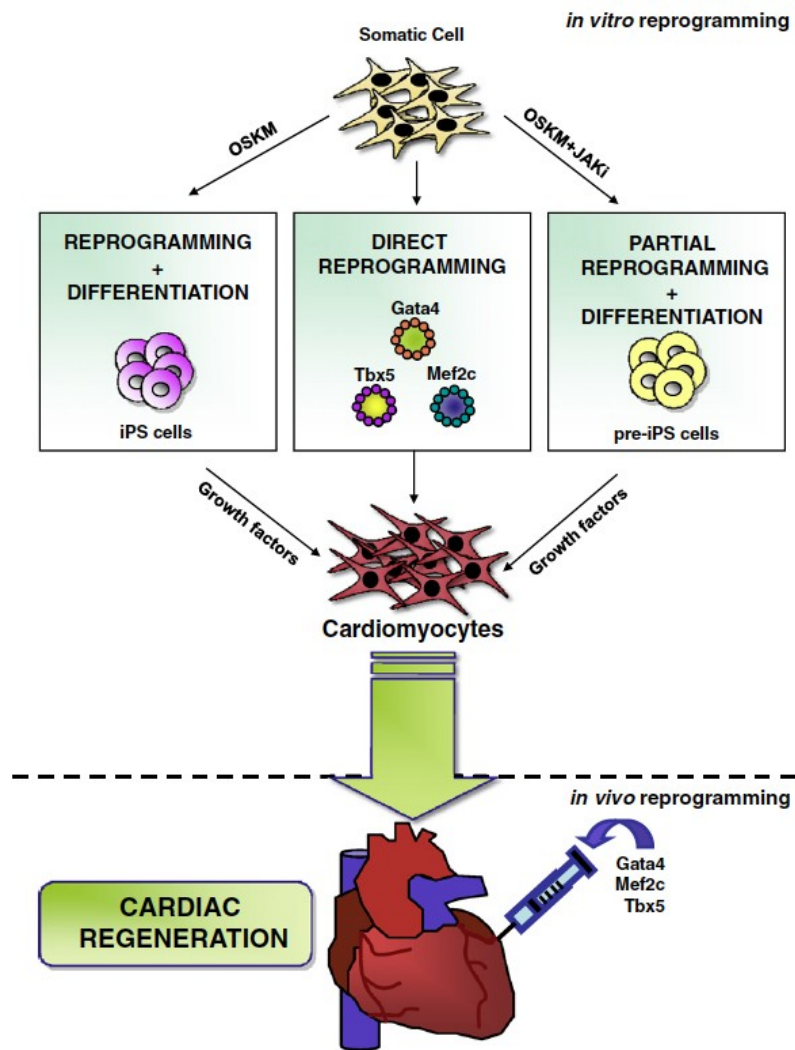


Figura 29. Esempi di strategie di Rigenerazione Cardiaca in vitro ed in vivo:

I Cardiomiociti si ottengono a partire da cellule iPS mediante trattamento in vitro con diverse citochine e fattori di crescita cardiaci.

I fattori OSKM (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc) determinano la riprogrammazione e la differenziazione delle cellule somatiche in cardiomiociti (a sinistra).

Gli stessi fattori addizionati all'inibitore della via di segnalazione JAK-STAT (JAKi), determinano una riprogrammazione parziale (a destra).

Infine, un metodo di riprogrammazione diretto, più rapido ed efficace, utilizza i fattori di trascrizione cardiaci GATA4/MEF2C/TBX5 e può essere sfruttato per la riprogrammazione in vivo (al centro).

(Iglesias-Garcia et al., 2013: Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modelling)

VIII. Cellule staminali Mesenchimali (MSCs)

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs) sono una popolazione di cellule staminali con elevata capacità proliferativa e potenziale di differenziazione multilineare.

Esse vengono ampiamente studiate perchè sono facili da isolare da tessuti diversi e sono in grado di differenziarsi in cellule di organi differenti (Chiu and Rao., 2011; Dhara et al., 2011; Caplan., 2013); questo le rende ottime candidate per la terapia cellulare e applicazioni di Medicina Rigenerativa.

Le MSCs derivano principalmente dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio che si differenzia intorno al terzo mese di gestazione e da cui originano i tessuti connettivi dell'organismo.

Il tessuto mesenchimale è costituito da un'abbondante matrice extracellulare in cui sono immerse le cellule mesenchimali; questo tessuto garantisce il supporto strutturale alle cellule e regola il traffico cellulare attraverso i tessuti.

Le MSCs possono originare anche da alcune porzioni degli altri foglietti embrionali, come ad esempio l'ectoderma della cresta neurale e l'endoderma della placca precordale (Ambrosi et al., 2001).

Ad oggi, si distinguono due popolazioni di MSCs:

La prima è localizzata nel midollo osseo; la seconda in alcune zone periferiche quali il tessuto adiposo, le ghiandole salivari, il tendine, la pelle, il muscolo, il legamento parodontale, il polmone e la lamina propria dell'intestino (Powell et al., 2011).

Le MSCs, anche dopo espansione in vitro, mantengono l'espressione di alcuni markers di superficie come il CD73, CD90 e CD105 (Lama et al., 2007).

Questi markers sono uniformemente espressi sulle MSCs isolate da tessuti di origine diversa (Majumdar et al., 2003; Vogel et al., 2003).

Le MSCs sono in grado di differenziarsi in cellule di origine mesenchimale, come osteociti, condrociti, adipociti e altre cellule del tessuto scheletrico (Pittenger et al., 1999), ma anche in cellule di origine non mesodermica quali cellule epiteliali della cute e del tubo digerente, del fegato e del polmone (Reyes et al., 2001; Dennis and Charbord., 2002) (*Figura 30*).

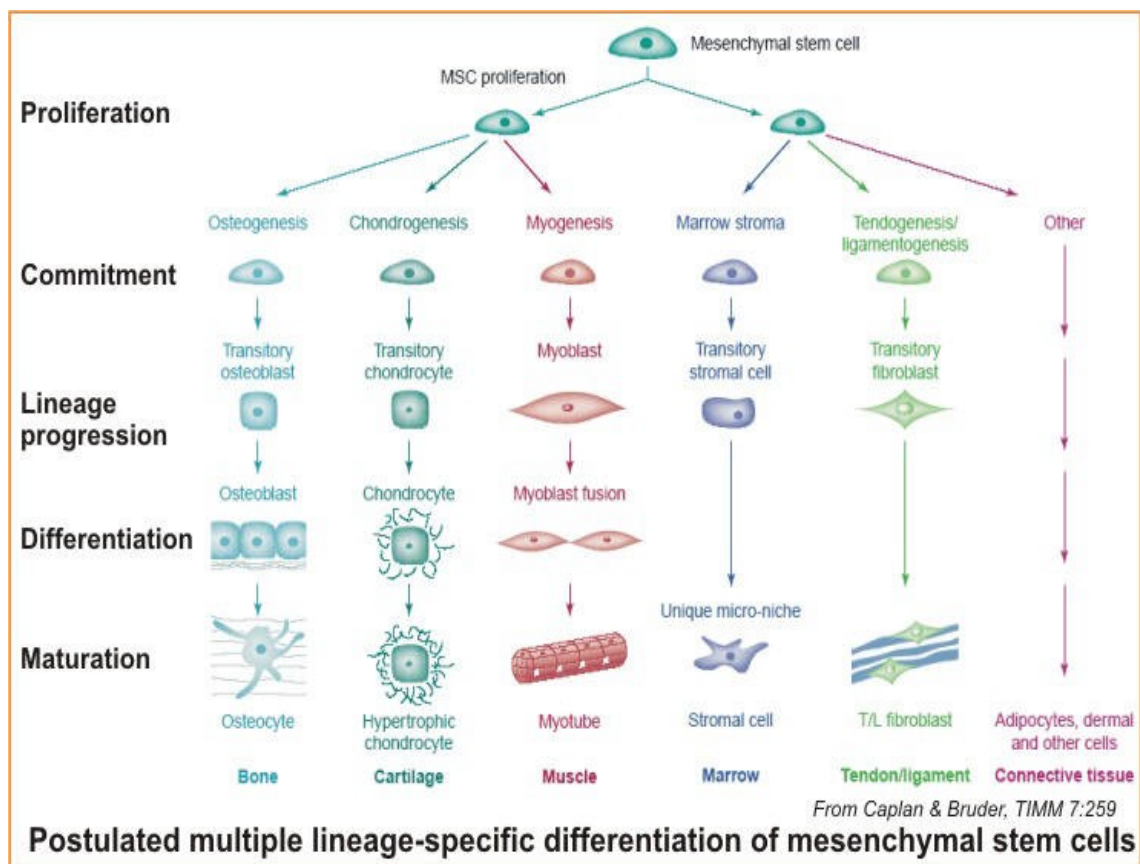


Figura 30. Linee cellulari derivanti da Cellule Staminali Mesenchimali.

(From Caplan and Bruder, TIMM 7:259)

Le Cellule Staminali Mesenchimali possiedono alcune caratteristiche uniche che le rendono utili per la modulazione farmacologica della rigenerazione degli organi e dei tessuti (Porada and Almeida-Porada., 2010).

Queste, dopo essere iniettate, raggiungono e si ancorano all'area di tessuto lesa, in particolare alle regione ipossiche, apoptotiche ed infiammate.

Successivamente, rilasciano alcuni fattori trofici quali citochine, chemochine e fattori di crescita, che stimolano il processo di rigenerazione endogena e modulano le risposte immunitarie.

Le MSCs inibiscono i processi di apoptosi, proteggono e riparano i tessuti tramite meccanismi paracrini, stimolano il reclutamento, la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali nei tessuti (Joyce et al., 2010).

Tali cellule, inoltre, contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi dei tessuti

danneggiati stimolando l'angiogenesi (Lazennec and Jorgensen., 2008; Uccelli et al., 2008).

Difatti, uno studio effettuato su un cuore danneggiato ha messo in luce le loro proprietà riparative e rigenerative del miocardio stimolando la crescita di nuovi vasi (Huang et al., 2009).

Queste cellule, una volta a contatto con il tessuto danneggiato, stimolano la secrezione di alcuni fattori di crescita, quali VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e bFGF (Basic Fibroblast growth factor), che inducono la formazione di nuovi vasi e migliorano la densità capillare, ripristinando il flusso sanguigno nella regione infartuata (Li et al., 2009).

Le MSCs, inoltre, inibiscono la sintesi e la deposizione di collagene nel cuore e rilasciano alcuni fattori paracrini che stimolano i fibroblasti cardiaci a secernere delle metalloproteinasi che inducono la degradazione della matrice fibrosa.

Questo suggerisce che le MSCs non solo riducono il danno tessutale, ma contribuiscono anche alla guarigione vera e propria di alcuni organi come il cuore e il fegato (Porada and Almeida-Porada., 2010).

In questo contesto, le Cellule Staminali Mesenchimali sono utili alla Farmacologia Rigenerativa come “fabbriche” per rilasciare fattori trofici o fattori immunosoppressivi o antiinfiammatori.

Le MSCs possono essere sfruttate anche come mezzi di veicolazione per la Farmacologia Rigenerativa, in grado di rilasciare agenti farmacologici promotori della rigenerazione delle funzionalità degli organi e dei tessuti (Mooney and Vandenburgh., 2008).

La capacità delle MSCs di migrare in vivo nei tessuti bersaglio suggerisce il loro potenziale uso come sistema di veicolazione cellulare per una grande varietà di molecole bioattive (Brink et al., 2012).

Da recenti studi sulle aritmie cardiache è emerso che le cellule MSCs prelevate dal midollo osseo umano che esprimono le connessine e possono formare gap junctions nel cuore, possono essere geneticamente modificate per esprimere un canale ionico richiesto, impiantate e funzionare da “pacemaker biologico” (Brink and Cohen., 2013). Per “connessine” si intende le proteine che costituiscono le giunzioni che collegano le cellule, chiamate “gap junctions”. Queste giunzioni sono formate dai connessioni,

costituite da sei molecole di connessine che circondano un canale acquoso centrale.

Le MSCs, se somministrate in vivo, hanno la capacità di accumularsi non solo in corrispondenza di organi o tessuti danneggiati ed infiammati, ma anche di localizzarsi nei tessuti cancerosi (Studeny et al., 2002, 2004; Hall et al., 2007).

Queste cellule staminali sembrano possedere la capacità di “percepire” la massa tumorale in formazione, migrare verso il tumore e contribuire alla formazione dello stroma tumorale (Hall et al., 2007). Quest'attività può essere sfruttata in vivo per veicolare alla massa tumorale agenti anticancro (Studeny et al., 2002, 2004; Hall et al., 2007; Hu et al., 2012).

Tuttavia, il ruolo delle Cellule Staminali Mesenchimali nello sviluppo tumorale è ancora molto controverso e verrà approfondito nel paragrafo successivo.

IX. Farmacologia Rigenerativa e Cancro

I tumori colpiscono organi o tessuti diversi e presentano cause diverse.

Indipendentemente dal tessuto/organo coinvolto, ogni tumore è caratterizzato da un accrescimento anomalo, determinato da una proliferazione incontrollata delle cellule.

La cellula tumorale, a differenza di quella sana, si divide anche quando non dovrebbe e genera un numero enorme di altre cellule con lo stesso difetto di controllo.

La trasformazione di una cellula da normale a tumorale è un processo lungo ed implica importanti trasformazioni del codice genetico che prendono il nome di “mutazioni somatiche” (Azzani et al., 2008).

La Farmacologia Tradizionale si basa sull'utilizzo di farmaci Chemioterapici.

I chemioterapici sono farmaci capaci di inibire la crescita incontrollata ed eccessiva delle cellule tumorali.

Essi vengono anche definiti farmaci “antiproliferativi” o “antiblastici”.

I Chemioterapici agiscono in modo diverso a seconda del tipo: alcuni arrestano la proliferazione delle cellule tumorali, altri ne provocano la morte, altri ancora fanno entrambe le cose.

I chemioterapici, però, non agiscono solo nei confronti delle cellule tumorali, ma colpiscono tutte le cellule dell'organismo in rapida proliferazione, comprese quelle sane. Questo è un limite significativo della Farmacologia Tradizionale e, ancora un volta, il punto di partenza della Farmacologia Rigenerativa, i cui migliori risultati, al momento, arrivano dalla Terapia Genica o da terapie a base di Cellule Staminali Mesenchimali.

Terapia Genica a base di Cellule Staminali Ematopoietiche:

Uno studio molto recente (Escobar et al., 2014) ha dimostrato che una terapia genica a base di staminali ematopoietiche può essere efficace non solo nel trattamento di alcune malattie genetiche (come la Leucodistrofia Metacromatica e la Sindrome di Wiskott-Aldrich), ma anche nella cura del tumore mammario e delle sue metastasi.

Lo studio di Luigi Naldini, direttore dell'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica, è stato pubblicato su “*Science Translational Medicine*” (1 Gennaio 2014). Questa terapia consiste in una tecnica di trasferimento genico e di ingegnerizzazione

delle cellule del sangue (i macrofagi) al trattamento dei tumori.

Le cellule staminali ematopoietiche del paziente vengono corrette geneticamente mediante l'introduzione del gene **Interferone alpha** con l'uso di vettori virali (Lentivirali).

Il gene scelto è quello responsabile dell'attività antitumorale nella progenie.

L'interferone alpha fa parte della famiglia degli Interferoni ed è una molecola normalmente prodotta dal nostro organismo in risposta alle infezioni, dotata inoltre di una potente attività antitumorale.

I meccanismi antitumorali dell'interferone alpha non sono ancora chiari e possono essere molteplici, come l'induzione della morte delle cellule tumorali oppure la stimolazione della risposta immunitaria contro il tumore.

L'interferone alpha, tuttavia, presenta una tossicità elevata, di conseguenza il suo utilizzo per via sistemica è limitato.

I ricercatori hanno inoculato nei pazienti cellule staminali ematopoietiche, usando come vettore una versione dell'HIV (*Human Immunodeficiency Virus*).

Questa tecnica è stata ideata nel 1996 proprio da Luigi Naldini.

Egli aveva intuito come il virus dell'HIV, opportunamente modificato, potesse essere efficace per trasportare i geni all'interno delle cellule.

I vettori Lentivirali sono *Lentivirus* appartenenti alla famiglia *Retroviridae* e conservano al loro interno solo il 10% della sequenza originaria di HIV.

Grazie al loro utilizzo è stato possibile correggere le cellule staminali ematopoietiche prelevate dal midollo osseo dei pazienti.

Il vettore lentivirale viene modificato in modo da assicurare che l'interferone alpha si accumuli solo nel tumore, evitando gli effetti tossici della somministrazione sistemica sull'organismo.

Il gene antitumorale si attiva solamente in una specifica frazione di cellule differenziate del sangue, ovvero i macrofagi che derivano dalle staminali ematopoietiche che, durante il processo di proliferazione tumorale, vengono richiamati dal circolo sanguigno ai tumori, dove svolgono un'azione che favorisce la proliferazione della massa tumorale. Quando l'interferone raggiunge la massa tumorale riprogramma il micro-ambiente del tumore da una condizione che favoriva la crescita tumorale, ad una condizione ostile. Il rilascio mirato dell'Interferone alpha esercita quindi una duplice azione contro il

cancro:

- 1) L'azione antitumorale è selettiva. Si evitano gli effetti sistemici.
- 2) I Macrofagi vengono riprogrammati da cellule che stimolavano la proliferazione tumorale a cellule con attività antitumorale (*Figura 31*).

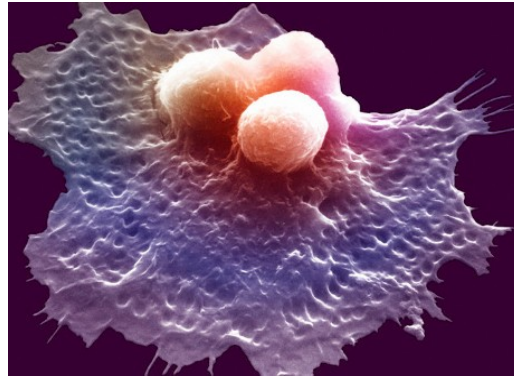


Figura 31. Macrofago che attacca tre cellule tumorali.
(*Science VU/W. J. Johnson/Visuals Unlimited/Corbis*)

Questo studio è risultato efficace nel bloccare la crescita del tumore mammario e delle sue metastasi in modelli murini e, ricreato un sistema ematopoietico umano nel topo, si dimostra che la terapia è sicura ed efficace nell'inibire la crescita anche di un tumore umano (Escobar et al., 2014).

Terapia a base di Cellule Staminali Mesenchimali:

Come già accennato nel paragrafo precedente, anche le Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs) possono essere sfruttate come veicolo di agenti antitumorali, grazie alla loro capacità di “percepire” la massa tumorale e migrare verso di essa (Studeny et al., 2002; Loebinger et al., 2009).

In realtà, non è ancora chiaro se le MSCs supportino o sopprimano la crescita del tumore, di conseguenza è ancora difficile capire il loro significato preciso nello sviluppo tumorale.

Ad oggi, le ipotesi sono due e del tutto contrastanti tra loro:

- 1) Le MSCs sopprimono la proliferazione tumorale
- 2) Le MSCs supportano la proliferazione tumorale

1) Le MSCs sopprimono la proliferazione tumorale:

Molte prove sperimentali sostengono il potenziale terapeutico delle MSCs nei confronti di diversi tipi di tumori, come il carcinoma epatocellulare (Gao et al., 2010), tumori cerebrali (Nakamizo et al., 2005) e sarcomi (Khakoo et al., 2006).

Sembra che l'effetto antitumorale si realizzi tramite la modulazione della via di segnalazione AKT.

Nello specifico, la somministrazione contemporanea di MSCs e di cellule provenienti da una linea cellulare di tumore cerebrale (glioma) determina una riduzione significativa del volume del tumore e della sua densità vascolare (Ho et al., 2013).

AKT (*Protein Kinase B*) è una serina-treonina chinasi del peso di 57 KDa (Franke et al., 2003) appartenente alla via di trasduzione del segnale PI3K/AKT/mTOR, illustrata in *Figura 32*.

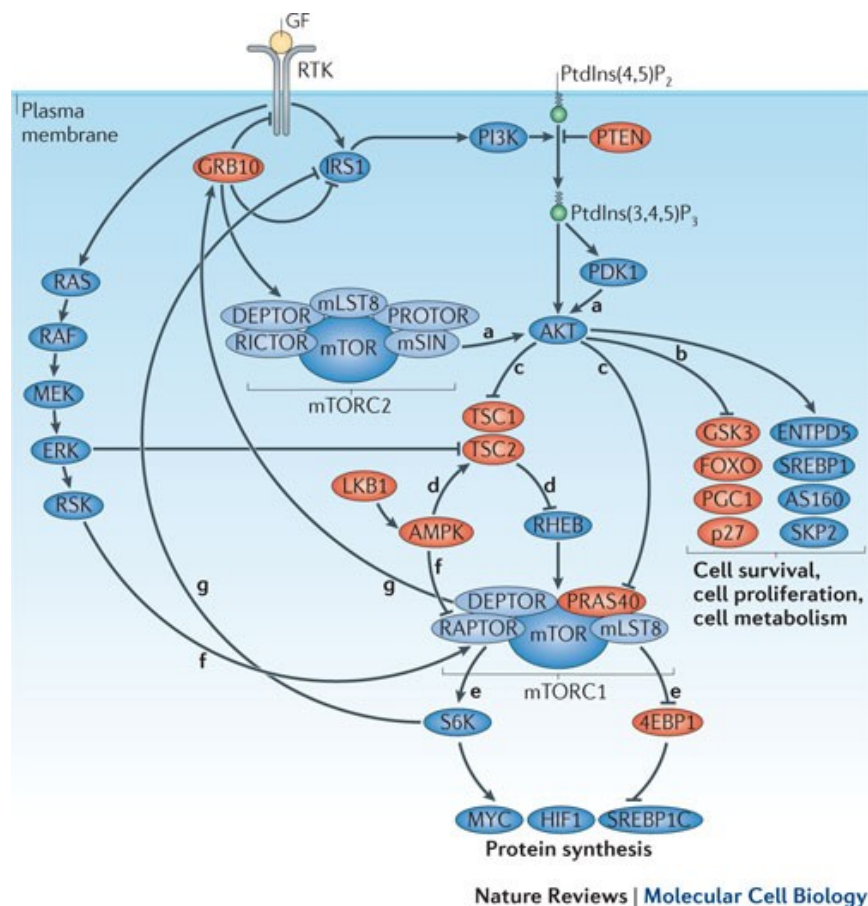


Figura 32. Via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR.

(*Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 283-296 (May 2012) doi:10.1038/nrm3330)

La cascata di segnalazione PI3K/AKT/mTOR ha un ruolo chiave nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo delle cellule.

Attualmente si stanno sviluppando molti farmaci antitumorali con bersaglio la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR, quali inibitori di PI3K, inibitori AKT ed inibitori del recettore mTOR, sia allosterici (come la Rapamicina), che inibitori del sito catalitico. In particolare, AKT viene direttamente attivata da PI3K ed è l'effettore maggiormente coinvolto nell'insorgenza e nello sviluppo di neoplasie (Engelman et al., 2006).

Il significato della via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR spiega l'efficacia delle MSCs nei trattamenti antitumorali.

Altri studi hanno descritto la possibilità di utilizzare le MSCs nelle tecniche di trasferimento genico come veicolo di agenti antitumorali, grazie alla loro capacità di produrre molecole anti-cancro, come il TNF (*Tumor necrosis factor*), TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) e l'interferone beta (Nakamizo et al., 2005; Loebinger et al., 2009; Grisendi et al., 2010).

In particolare, TRAIL fa parte della superfamiglia di citochine del TNF.

Queste citochine rivestono un ruolo importante nella regolazione dell'apoptosi, nella risposta immunitaria e nell'infiammazione (Vaccarezza et al., 2007).

I Ligandi e i recettori della superfamiglia del TNF, tra cui TRAIL, sono trasduttori del segnale ed influenzano lo sviluppo, l'omeostasi e le risposte adattative di molte cellule e tessuti.

Nello specifico, TRAIL risulta capace di indurre l'apoptosi delle cellule tumorali, ma non di quelle sane; questo ha suggerito il suo possibile utilizzo come agente terapeutico antitumorale (Baetu and Hiscott., 2002).

Questi studi dimostrano la possibilità delle MSCs di sopprimere la proliferazione della massa tumorale.

2) Le MSCs supportano la proliferazione tumorale:

Alcuni modelli sperimentali hanno descritto l'abilità delle MSCs di promuovere la proliferazione tumorale tramite modulazione immunitaria (Karnoub et al., 2007).

I ricercatori degli Istituti di genetica e biofisica di Napoli (Igb-Cnr) e per le

applicazioni del calcolo di Roma (Iac-Cnr), in collaborazione con Ifom di Milano (*Institute of Molecular Oncology Foundation*), hanno identificato un regolatore della motilità delle MSCs, cioè il meccanismo che permette il loro movimento ed invasione dei tessuti.

Ad innescare questo è la L-Prolina, un aminoacido non essenziale che induce particolari cambiamenti epigenetici che modificano l'espressione genica, innescando nelle cellule MSCs un processo di EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*), ovvero il meccanismo con cui le cellule tumorali perdono le loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono le proprietà migratorie mesenchimali; in questo modo le cellule maligne della massa tumorale diventano più invasive e in grado di diffondere nell'organismo formando metastasi a distanza. Il processo EMT è illustrato in *Figura 33*.

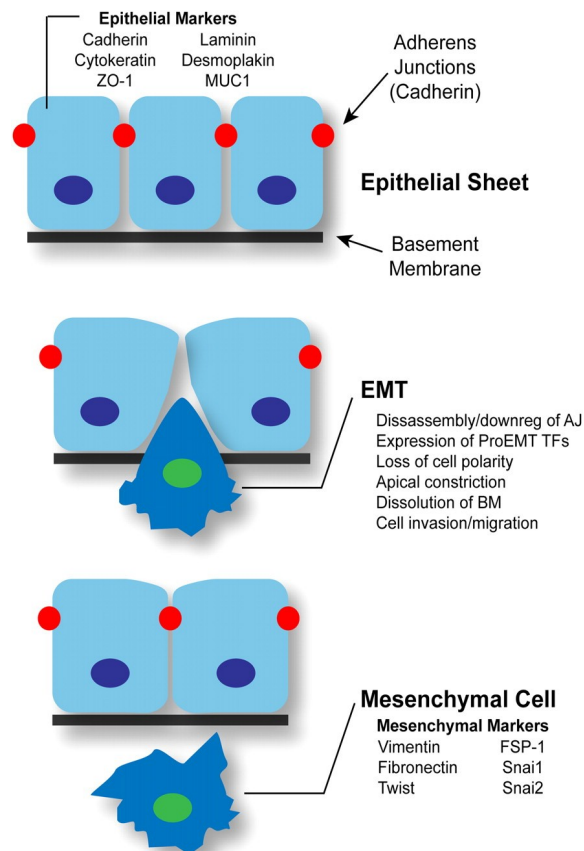


Figura 33. Meccanismo di trasformazione EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition).

(Von Gise A and Pu WT *Circulation Research.*, 2012;110:1628-1645)

Il processo di trasformazione EMT viene regolato dal micro-ambiente della cellula, in particolar modo dalla matrice extracellulare che è molto ricca di collagene, una proteina

costituita prevalentemente dall'aminoacido Prolina.

Durante l'accrescimento della massa tumorale si verifica la degradazione della matrice extracellulare e, di conseguenza, si rende disponibile la Prolina che, appunto, modifica l'espressione dei geni, senza modificare le sequenze di DNA delle cellule.

Grazie allo studio di Comes et al. (2013), siamo a conoscenza del meccanismo che permette ad una cellula MSC di acquisire la capacità di movimento e di invasione dei tessuti generando le metastasi (*Figura 34*).

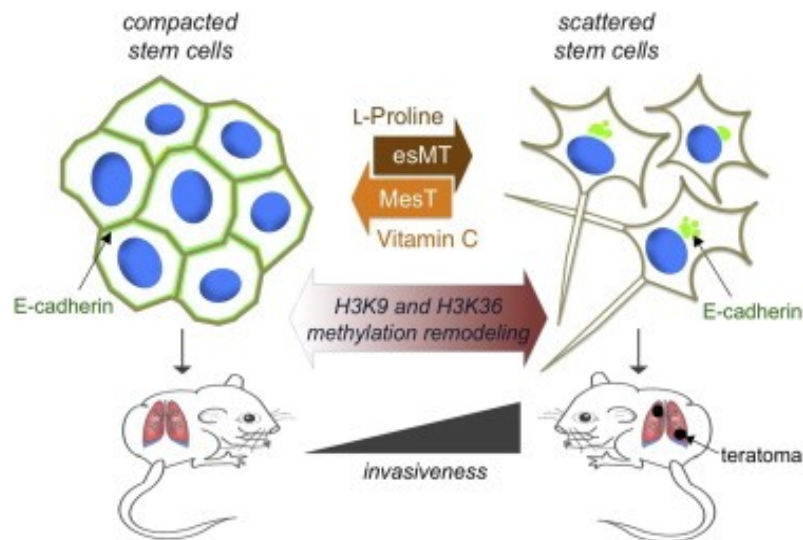


Figura 34. Il ruolo della L-Prolina nel processo EMT: L'invasività aumenta all'aumentare della concentrazione di L-Prolina, fino all'insorgenza del teratoma. Il fenomeno è inversamente proporzionale alla concentrazione di vitamina C (Acido Ascorbico).

(Comes et al., 2013: *Stem Cell Reports*, Volume 1, Issue 4, 07-321, 10 October 2013 Copyright © 2013 The Authors 10.1016/j.stemcr.2013.09.001)

A favore di questa ipotesi, Karnoub et al. (2007) hanno riscontrato che la somministrazione contemporanea di MSCs e di cellule provenienti da una linea cellulare di tumore al seno determina un incremento nel numero di metastasi, pur non verificandosi un aumento significativo nella crescita locale del tumore.

Questo si evidenzia anche in altri tipi di tumori, come quello del colon, linfomi e melanomi (Djouand et al., 2003; Ame-Thomas et al., 2007; Shinagawa et al., 2010).

Per cercare una risposta a questo fenomeno, Torsvik e colleghi (2010) suggeriscono che la proliferazione del tumore possa dipendere dalla contaminazione crociata tra Cellule Staminali Mesenchimali e cellule tumorali.

Secondo Klopp et al. (2011), l'aumento della massa tumorale osservata in questi

rapporti potrebbe essere correlato ad una trasformazione delle MSCs in vere e proprie cellule tumorali.

Le colture di Cellule Staminali Mesenchimali umane, in quanto cellule fortemente indifferenziate, potrebbero subire una trasformazione maligna spontanea e differenziarsi in cellule del tumore stesso, rendendolo ancora più aggressivo.

Difatti, nelle terapie rigenerative che utilizzano cellule staminali, le popolazioni cellulari differenziate, spesso, contengono ancora piccole quantità di cellule indifferenziate e, per questo motivo, possono dare il via allo sviluppo di tumori, in particolare di teratomi (tumori che si sviluppano dal tessuto embrionale).

Diventa quindi fondamentale eliminare ogni residuo di cellule staminali pluripotenti dalle popolazioni cellulari impiegate a scopo terapeutico.

A questo proposito, lo studio di Ben-David et al. (2013) ha individuato una proteina, denominata Claudina-6, presente esclusivamente sulla superficie delle cellule staminali pluripotenti umane.

Il gruppo di ricerca del Silberman Institute of Life Sciences della Hebrew University a Gerusalemme, in Israele, ha ideato tre diversi metodi di “pulizia” per riconoscere ed eliminare le cellule che esprimono questa proteina di superficie:

- 1) Utilizzo di un anticorpo selettivo contro la Claudina-6
- 2) Utilizzo di un anticorpo coniugato ad una citotossina, ovvero una sostanza in grado di danneggiare o distruggere la cellula
- 3) Utilizzo di un anticorpo coniugato ad una enterotossina, ovvero una proteina tossica per la cellula, prodotta dal batterio *Clostridium Perfringens*.

In tutti e tre i casi le terapie rigenerative risultano notevolmente più sicure (Ben-David et al., 2013).

Variabili che influenzano i risultati:

Le variabili che, ad ogni sperimentazione, modulano il comportamento delle MSCs, sono:

- La scelta della popolazione di MSCs;
- La variabilità individuale del donatore di MSCs;
- La secrezione di specifiche molecole da parte delle cellule maligne (Fattori di

crescita, citochine, chemochine);

- La Modalità di inoculazione e la tempistica di somministrazione delle MSCs nel paziente;
- L'espressione variabile di alcuni recettori, come i recettori TLR (*Toll-like receptors*), durante i vari step del trattamento (Liotta et al., 2008).

[Per recettori TLR si intende una famiglia di recettori molto importante nei processi di immunità innata; questi, tramite vie di segnalazione non ancora del tutto chiare, aumentano la produzione di citochine infiammatorie e di linfociti T-helper].

Fra tutte le variabili che influenzano i risultati, la scelta della popolazione di MSCs da prelevare non è un fattore trascurabile.

Difatti, Brandau et al. (2010) hanno confrontato le MSCs del midollo osseo con quelle delle porzioni periferiche, suggerendo che le due popolazioni di Cellule Staminali non sono del tutto identiche.

Da Silva Meirelles e colleghi (2008) hanno posto l'attenzione sulle differenze nel grado di differenziazione tra le MSCs provenienti da tessuti diversi ed è emerso che quelle isolate dal midollo osseo possiedono una migliore “capacità vitale” all'interno della massa tumorale (Hung et al., 2005; Nakamizo et al., 2005; Loebinger et al., 2009) rispetto alle MSCs prelevate dai tessuti periferici, quali il tessuto adiposo (Grisendi et al., 2010) o il sangue del cordone ombelicale (Hu et al., 2011).

Per “capacità vitale” si fa riferimento al termine inglese “*Homing capacity*”, ovvero la capacità delle Cellule Staminali Mesenchimali di migrare verso la massa tumorale e vivere al suo interno.

Grazie agli studi descritti, possiamo affermare che le MSCs possiedono la capacità di migrare verso i tessuti danneggiati, infiammati o tumorali e, in quest'ultimo caso, le possibilità sono due: sopprimere la crescita tumorale o, viceversa, supportarla e trasformarsi in cellule maligne.

Il percorso intrapreso può essere regolato e modulato da alcune molecole secrete dalle cellule tumorali quali citochine, chemochine e fattori di crescita.

Per esempio, le MSCs manifestano un comportamento invasivo nei confronti del glioma, nel quale viene fortemente espresso il fattore di crescita VEGF (*Vascular endothelial growth factor*).

Ritter et al. (2008) hanno riportato che VEGF stimola la migrazione delle MSCs al

tumore per mezzo del legame con i suoi recettori, che si trovano espressi sulla superficie delle MSCs.

Di conseguenza, l'utilizzo di anticorpi contro VEGF diminuisce il potere delle MSCs di migrare verso la massa tumorale.

Grazie agli studi di Otsu et al. (2009) sappiamo anche che le MSCs migrano verso i capillari ed inibiscono l'angiogenesi tumorale.

Di conseguenza, VEGF promuove la formazione dei nuovi vasi tumorali, ma le MSCs fanno esattamente l'opposto.

Questi studi dimostrano come alcuni tumori maligni, come il glioma, possono creare ambienti favorevoli all'attecchimento selettivo delle Cellule Staminali Mesenchimali.

Al momento però, i fattori secreti dalle cellule dei tessuti maligni, nonché quelli rilasciati dai tessuti circostanti e dai vasi, sono in buona parte ancora sconosciuti.

Inoltre, il significato delle MSCs è ancora da comprendere a fondo e molte domande sono ancora prive di spiegazioni specifiche o adeguate.

X. Conclusioni

La Farmacologia Rigenerativa è un settore ampio della ricerca medica che comprende non solo gli studi sulla rigenerazione degli organi e dei tessuti, ma anche quelli su Cellule Staminali, “Piccole molecole” riprogrammanti, Morfogenesi, Terapie Geniche e applicazioni di ingegneria biomedica.

Riflettendo sui risultati ottenuti dai diversi studi, si può giungere alla conclusione che la Farmacologia Rigenerativa rappresenta un significativo punto di partenza dagli approcci tradizionali focalizzati sul sollievo palliativo e sintomatico delle alterazioni patologiche. La Medicina Rigenerativa potrebbe rivoluzionare le terapie per le malattie cardiache e le patologie neurodegenerative, risolvere il problema della mancanza di organi per la donazione e rigenerare i tessuti danneggiati.

Tuttavia, nonostante i grossi passi in avanti, i meccanismi che stanno alla base dei fenomeni riparativi e rigenerativi dei tessuti non sono ancora totalmente conosciuti ed il comportamento di alcune cellule, come le Cellule Staminali Mesenchimali, è ancora da comprendere a fondo.

Di conseguenza, la strada da percorrere è lunga, ma le premesse iniziali sono buone e i

risultati futuri potrebbero essere grandiosi, come:

- Realizzare terapie personalizzate paziente-specifiche;
- Sviluppare nuovi farmaci in grado di effettuare terapie non sistemiche, ma localizzate, senza effetti collaterali indesiderati;
- Usare composti con attività multipla che, caricati in sofisticati sistemi di trasporto di farmaci, somministrati localmente, siano in grado di riprodurre una rigenerazione funzionale completa;
- Ricostruire con sufficiente precisione la complessità dell'intero organismo per creare in vitro nuovi organi o tessuti da impiantare successivamente in vivo;
- Veicolare selettivamente in vivo prodotti genici anti-cancro alle cellule tumorali.

Sono queste, e molte altre ancora, le potenzialità della Farmacologia Rigenerativa.

GLOSSARIO

AADC: *Aromatic L-amino acid decarboxylase*
AAV: *Adeno-associated virus*
ADA: *Adenosine deaminase*
AFS: *Amniotic fluid-derived stem cells*
AhR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*
AKT: *Protein kinase B*
AMD: *Age-Related Macular Degeneration*
ANGPTL5: *Angiopoietin-like protein 5*
ARSA: *Arylsulfatase A*
BAM: *Bladder acellular matrix*
beta-TRCP: *Beta-Transducin Repeat Containing Protein*
bFGF: *Basic Fibroblast Growth Factor*
BMP-4: *Bone morphogenetic protein 4*
BrdU: *Bromodeoxyuridine*
CHMP: *European Committee for Medicinal Products for Human Use*
CiRA: *Center for iPS Research and Application*
EGF: *Epidermal growth factor*
EMT: *Epithelial to Mesenchymal Transition*
ES: *Embryonic stem cells*
EPO: *Erythropoietin*
EUROCISS: *European Cardiovascular Indicators Surveillance Set*
FDA: *Food and Drug Administration*
FGF-10: *Fibroblast growth factor 10*
GABA: *Gamma-AminoButyric Acid*
GAD: *Glutamate decarboxylase*
G-CSF: *Granulocyte colony-stimulating factor*
GDNF: *Glial cell-derived neurotrophic factor*
Gli-1: *Glioma-associated oncogene homolog 1*
GSK3-beta: *Glycogen synthase kinase 3 beta*
GTPCH: *GTP Cyclohydrolase I*
HGF: *Hepatocyte growth factor*

HIV: *Human immunodeficiency virus*

HpSC: *Hepatic stem cells*

HSC: *Hematopoietic stem cells*

HuCNS-SC: *Human central nervous system stem cells for neurological diseases*

Ifom: *Institute of Molecular Oncology Foundation*

IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*

iPS: *Induced Pluripotent Stem Cell*

MEK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MSCs: *Mesenchymal stem cells*

NELL-1: *NEL-like molecule-1*

NGF: *Nerve growth factor*

NCL: *Neuronal ceroid-lipofuscinoses*

NSC: *Neural Stem cells*

NTN: *Neuroturtina*

OCT-4: *Octamer-binding transcription factor 4*

PDE2: *Phosphodiesterase 2*

ROCK: *Rho-associated protein kinase*

SCF: *Stem cell factor*

SCNT: *Somatic cell nuclear transfer*

SDF-1: *Stromal cell-derived factor 1*

Shh: *Sonic Hedgehog Homolog*

Src: *Proto-oncogene Tyrosine-protein kinase*

SR1: *StemRegenin 1*

STAP: *Stimulus-triggered acquisition of pluripotency*

TGF-beta: *Transforming growth factor beta*

TH: *Tyrosine Hydroxylase*

TIGET: *San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy*

TLR: *Toll-Like Receptors*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

Wasp: *Wiskott-Aldrich Syndrome protein*

6-OHDA: *6-Hydroxydopamine*

BIBLIOGRAFIA

Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Canamero M, Rayon T, Ors I, Grana O, Megias D, Dominguez O, Martinez D, Manzanares M, Ortega S and Serrano SO (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 502, 340-345. doi: 10.1038/nature12586.

Agholme F and Aspenberg P (2011) Wnt signaling and orthopedics, an overview. *Acta Orthop* 82:125–130.

Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A et al (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science*. Vol. 341 no. 6148. doi: 10.1126/science.1233151.

Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S., et al (2007). Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 109, 693-702. doi: 10.1182/blood-2006-05-020800.

Ambroggi G et al., (2001). Embriologia e organogenesi in *Anatomia dell'uomo*. Edi. Ermes, Editor 2001: Milano.

Andersson KE, Chapple CR, Cardozo L, Cruz F, Hashim H, Michel MC, Tannenbaum C, and Wein AJ (2009) Pharmacological treatment of overactive bladder: report from the International Consultation on Incontinence. *Curr Opin Urol* 19: 380–394.

Andersson KE and Christ GJ (2007) Regenerative pharmacology: the future is now. *Mol Interv* 7:79–86.

Aron L and Klein R (2011). Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 34:88–100.

Asano T, Suzuki T, Tsuchiya M, Satoh S, Ikegaki I, Shibuya M, Suzuki Y and Hidaka H (1989). Vasodilator actions of HA1077 in vitro and in vivo putatively mediated by the inhibition of protein kinase, *Br J. Pharmacol.* 98,1091-1100.

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, and Retik AB (2006) Tissue-engineered autologous bladders for

patients needing cystoplasty. *Lancet* 367:1241–1246.

Atkinson SP, Lako M, and Armstrong L (2013) Potential for pharmacological manipulation of human embryonic stem cells. *Br J Pharmacol* 169:269–289.

Azzani T, Barberi M, Bucci B, Codignola A, Eoli M, Marili R, Miglioranza A et al (2008). Guida alla prevenzione a cura della fondazione Umberto Veronesi, Volume 3 (cuore)/Volume 4 (oncologia). RCS Quotidiani Spa.

Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, and Macchiarelli P (2012). Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet* 379:943–952.

Baetu TM and Hiscott J (2002). On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Jun;13(3):199-207.

Baghbaderani BA, Mukhida K, Hong M, Mendez I, and Behie LA (2011) A review of bioreactor protocols for human neural precursor cell expansion in preparation for clinical trials. *Curr Stem Cell Res Ther* 6:229–254.

Balmayor ER, Tuzlakoglu K, Marques AP, Azevedo HS, and Reis RL (2008) A novel enzymatically-mediated drug delivery carrier for bone tissue engineering applications: combining biodegradable starch-based microparticles and differentiation agents. *J Mater Sci Mater Med* 19:1617–1623.

Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL, Sanchez-Pernaute R, Pivrotto P, Bringas J, Herscovitch P, Carson RE, Eckelman W, and Reutter B, et al. (2006) Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAVhAADC. *Mol Ther* 14:564–570.

Banquy X, Leclair G, Rabanel JM, Argaw A, Bouchard JF, Hildgen P, and Giasson S (2008) Selectins ligand decorated drug carriers for activated endothelial cell targeting. *Bioconjug Chem* 19:2030–2039.

Bartunek J, Vanderheyden M, Hill J, and Terzic A (2010) Cells as biologics for cardiac repair in ischaemic heart failure. *Heart* 96:792–800.

Bartus RT, Herzog CD, Chu Y, Wilson A, Brown L, Siffert J, Johnson EMJ Jr, Olanow CW, Mufson EJ, and Kordower JH (2011) Bioactivity of AAV2-neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains. *Mov Disord* 26:27–36.

Ben-David U, Nudel N and Benvenisty N (2013). Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nature Communications*.

4, Article number:1992. Doi: 10.1038/ncomms2992.

Bentzinger CF, Wang YX, and Rudnicki MA (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:4.

Bergström T and Forsberg-Nilsson K (2012) Neural stem cells: brain building blocks and beyond. *Ups J Med Sci* 117:132–142.

Bessa PC, Machado R, Nürnberger S, Dopler D, Banerjee A, Cunha AM, Rodríguez- Cabello JC, Redl H, van Griensven M, and Reis RL, et al. (2010) Thermoresponsive self-assembled elastin-based nanoparticles for delivery of BMPs. *J Control Release* 142:312–318.

Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, and Denison MS, et al. (2010) Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329:1345–1348.

Boland T, Xu T, Damon B, and Cui X (2006) Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol J* 1:910–917.

Bonnefoix T and Callanan M (2010) Accurate hematopoietic stem cell frequency estimates by fitting multicell Poisson models substituting to the single-hit Poisson model in limiting dilution transplantation assays. *Blood* 116:2472–2475.

Borden MA, Zhang H, Gillies RJ, Dayton PA, and Ferrara KW (2008) A stimulus responsive contrast agent for ultrasound molecular imaging. *Biomaterials* 29: 597–606.

Boucard N, Viton C, Agay D, Mari E, Roger T, Chancerelle Y, and Domard A (2007) The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third degree burns. *Biomaterials* 28:3478–3488.

Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F., et al (2010). Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1005-1015. doi: 10.1189/jlb.0410207.

Brave M, Farrell A, Ching Lin S, Ocheltree T, Pope Miksinski S, Lee SL, Saber H, Fourie J, Tornøe C, and Booth B, et al. (2010) FDA review summary: Mozobil in combination with granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous transplantation. *Oncology* 78:282–288.

Brey DM, Chung C, Hankenson KD, Garino JP, and Burdick JA (2010) Identification of osteoconductive

and biodegradable polymers from a combinatorial polymer library. *J Biomed Mater Res A* 93:807–816.

Brey DM, Motlekar NA, Diamond SL, Mauck RL, Garino JP, and Burdick JA (2011) High throughput screening of a small molecule library for promoters and inhibitors of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biotechnol Bioeng* 108:163–174.

Brink PR and Cohen IS (2013) Gap junction-mediated therapies to eliminate cardiac arrhythmias, in *Regenerative Pharmacology* (Christ G and Andersson K-E, eds, ed) pp 237–251, Cambridge University Press, New York.

Brink PR, Valiunas V, Gordon C, Rosen MR, and Cohen IS (2012) Can gap junctions deliver? *Biochim Biophys Acta* 1818:2076–2081.

Brockes JP and Kumar A (2008) Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:525–549.

Bryder D, Rossi DJ, and Weissman IL (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169:338–346.

Burks MV and Nair L (2010) Long-term effects of bone morphogenetic protein- based treatments in humans. *J Long Term Eff Med Implants* 20:277–293.

Burmeister D, Aboushwareb T, Tan J, Link K, Andersson KE, and Christ G (2010) Early stages of in situ bladder regeneration in a rodent model. *Tissue Eng Part A* 16:2541–2551.

Burton P, Adams DR, Abraham A, Allcock RW, Jiang Z, McCahill A, Gilmour J, McAbney J, Kane NM, and Baillie GS, et al. (2010a) Identification and characterization of small-molecule ligands that maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans* 38:1058–1061.

Burton P, Adams DR, Abraham A, Allcock RW, Jiang Z, McCahill A, Gilmour J, McAbney J, Kaupisch A, and Kane NM, et al. (2010b) Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) blocks differentiation and maintains the expression of pluripotency markers in human embryonic stem cells. *Biochem J* 432:575–584.

Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A, Dusich J, Bachmann MH, Negrin RS, Weissman IL, and Contag CH (2004) Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:221–226.

Caplan AI (2013) Adult mesenchymal stem cells and the NO pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*

110:2695–2696.

Carragee EJ, Hurwitz EL, and Weiner BK (2011) A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 11:471–491.

Chan SS, Li HJ, Hsueh YC, Lee DS, Chen JH, Hwang SM, Chen CY, Shih E, and Hsieh PC (2010) Fibroblast growth factor-10 promotes cardiomyocyte differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 5:e14414.

Chang CC, Boland ED, Williams SK, and Hoying JB (2011) Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98:160–170.

Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, and Williams NS, et al. (2009) Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* 5:100–107.

Chen G, Hou Z, Gulbranson DR and Thomson JA: Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, 7, 240-248 (2010).

Chiu AY and Rao MS (2011) Cell-based therapy for neural disorders—anticipating challenges. *Neurotherapeutics* 8:744–752.

Choi Y and Nam TG (2012) Chemical biology in stem cell research. *Arch Pharm Res* 35:281–297.

Christ GJ, Saul JM, Furth ME, Andersson KE (2013) The Pharmacology of Regenerative Medicine. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacol Rev* 65:1091-1133.

Columbano A and Shinozuka H (1996) Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J* 10:1118–1128.

Comes S, Gagliardi M, Laprano N, Fico A, Cimmino A, Palamidessi A, De Cesare D, De Falco S, Angelini C, Scita G, Patriarca EJ, Matarazzo MR and Minchiotti G (2013). L-Proline induces a mesenchymal-like invasive program in embryonic stem cells by remodeling H3K9 and H3K36 methylation. *Stem Cell Reports*, volume 1, Issue 4, 307-321. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.09.001.

Connelly JT, Petrie TA, García AJ, and Levenston ME (2011) Fibronectin- and collagen-mimetic ligands regulate bone marrow stromal cell chondrogenesis in three-dimensional hydrogels. *Eur Cell Mater* 22:168–176, discussion 176–177.

Corona BT, Ward CL, Harrison BS, and Christ GJ (2010) Regenerative medicine: basic concepts, current status, and future applications. *J Investig Med* 58:849–858.

Cova L, Armentero MT, Zennaro E, Calzarossa C, Bossolasco P, Busca G, Lambertenghi Delilieri G, Polli E, Nappi G, and Silani V, et al. (2010) Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1311:12–27.

Crossley GH (2000) Cardiac pacing leads. *Cardiol Clin* 18:95–112, viii–ix viii–ix.

Csaszar E, Kirouac DC, Yu M, Wang W, Qiao W, Cooke MP, Boitano AE, Ito C, and Zandstra PW (2012) Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling. *Cell Stem Cell* 10:218–229.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI and Nardi NB (2008). In search of the vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells* 26, 2287-2299. doi:10.1634/stemcells.2007-1122.

Dauer W and Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909.

David G, Cristea M, Balhui C, Timpu D, Doroftei F, and Simionescu BC (2012) Effect of cross-linking methods on structure and properties of poly(ε-caprolactone) stabilized hydrogels containing biopolymers. *Biomacromolecules* 13:2263–2272.

Davis SP, Martanto W, Allen MG, and Prausnitz MR (2005) Hollow metal microneedles for insulin delivery to diabetic rats. *IEEE Trans Biomed Eng* 52:909–915.

De Bie C (2007) Genzyme: 15 years of cell and gene therapy research. *Regen Med* 2: 95–97.

De Luca M, Pellegrini G, and Green H (2006) Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts. *Regen Med* 1:45–57.

DeLaForest A, Nagaoka M, Si-Tayeb K, Noto FK, Konopka G, Battle MA, and Duncan SA (2011) HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells. *Development* 138:4143–4153.

Dennis JE and Charbord P (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem cells* 2002.

Demento SL, Cui W, Criscione JM, Stern E, Tulipan J, Kaech SM, and Fahmy TM (2012) Role of

sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials* 33:4957–4964.

Despots C and Ding S (2010) Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol* 636:207–218.

Deuel TF, Zhang N, Yeh HJ, Silos-Santiago I, and Wang ZY (2002) Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway. *Arch Biochem Biophys* 397:162–171.

Dhara SK, Majumder A, Dodla MC, and Stice SL (2011) Nonviral gene delivery in neural progenitors derived from human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 767:343–354.

Djouand F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J et al (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844. doi: 10.1182/blood-2003-04-1193.

Donaldson AE, Cai J, Yang MI, and Iacovitti L (2009) Human amniotic fluid stem cells do not differentiate into dopamine neurons in vitro or after transplantation in vivo. *Stem Cells Dev* 18:1003–1012.

Drake AC, Khoury M, Leskov I, Iliopoulou BP, Fragoso M, Lodish H, and Chen J (2011) Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2rg^{-/-} (NSG) mice. *PLoS ONE* 6:e18382.

Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, Chen J, and Ding S (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 13:215–222.

Engelman JA, Luo J and Cantley LC (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7:606-19.

Escobar G, Moi D, Ranghetti A, Ozkal-Baydin P, Squadrito ML, De Palma M, Mazzieri R and Naldini L (2014). Genetic engineering of hematopoiesis for targeted IFN- α delivery inhibits breast cancer progression. *Sci Transl Med*. Doi: 10.1126/scitranslmed.3006353.

Evseenko D, Zhu Y, Schenke-Layland K, Kuo J, Latour B, Ge S, Scholes J, Dravid G, Li X, and MacLellan WR, et al. (2010) Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13742–13747.

Fairchild PJ (2009) Transplantation tolerance in an age of induced pluripotency. *Curr Opin Organ*

Transplant 14:321–325.

Faulds D and Sorkin EM (1989) Epoetin (recombinant human erythropoietin). A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in anaemia and the stimulation of erythropoiesis. *Drugs* 38:863–899.

Feng Z and Gao F (2012) Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease. *CNS Neurosci Ther* 18:142–148.

Foster S, Duvall CL, Crownover EF, Hoffman AS, and Stayton PS (2010) Intracellular delivery of a protein antigen with an endosomal-releasing polymer enhances CD8 T-cell production and prophylactic vaccine efficacy. *Bioconjug Chem* 21:2205–2212.

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA and Sugimoto C (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22:8983–98.

Frampton JE, Lee CR, and Faulds D (1994) Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs* 48:731–760.

Frederiksen H, Arner A, Malmquist U, Scott RS, and Uvelius B (2004) Nerve induced responses and force-velocity relations of regenerated detrusor muscle after subtotal cystectomy in the rat. *Neurourol Urodyn* 23:159–165.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, and Trojanowski JQ, et al. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710–719.

Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, Radisic M, Sefton MV, Kaplan D, and Vunjak-Novakovic G (2006) Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng* 12:3285–3305.

Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, and Yin S (2001) Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A(Pt 2, Suppl 1):S151–S158.

Fujihara Y, Koyama H, Ohba M, Tabata Y, Fujihara H, Yonehara Y, and Takato T (2008) Controlled delivery of bFGF to recipient bed enhances the vascularization and viability of an ischemic skin flap. *Wound Repair Regen* 16:125–131.

Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T, and Wagner WR (2007a) In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. *Ann Thorac Surg* 83:648–654.

Fujimoto KL, Tobita K, Merryman WD, Guan J, Momoi N, Stolz DB, Sacks MS, Keller BB, and Wagner WR (2007b) An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 49:2292–2300.

Funakoshi N, Duret C, Pascussi JM, Blanc P, Maurel P, Daujat-Chavanieu M, and Gerbal-Chaloin S (2011) Comparison of hepatic-like cell production from human embryonic stem cells and adult liver progenitor cells: CAR transduction activates a battery of detoxification genes. *Stem Cell Rev* 7:518–531.

Furth ME, Atala A, and Van Dyke ME (2007) Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28:5068–5073.

Furth ME, Childers MK, and Reid LM (2013) Stem and progenitor cells in regenerative pharmacology (Christ GJ and Andersson KE, eds, ed) pp 75–126, Cambridge University Press, New York.

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433–1438.

Gao Y, Yao A, Zhang W, Lu S, Yu Y, Deng L et al (2010). Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oncogene* 29, 2784–2794. doi:10.1038/onc.2010.38.

Gasmi M, Brandon EP, Herzog CD, Wilson A, Bishop KM, Hofer EK, Cunningham JJ, Printz MA, Kordower JH, and Bartus RT (2007a) AAV2-mediated delivery of human neurturin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 27:67–76.

Gasmi M, Herzog CD, Brandon EP, Cunningham JJ, Ramirez GA, Ketchum ET, and Bartus RT (2007b) Striatal delivery of neurturin by CERE-120, an AAV2 vector for the treatment of dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *Mol Ther* 15:62–68.

Gazit R, Weissman IL, and Rossi DJ (2008) Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system. *Semin Hematol* 45:218–224.

Georgieva JV, Kalicharan D, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Hoekstra D, and Zuhorn IS (2011) Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *Mol Ther* 19:318–325.

Gersh BJ, Simari RD, Behfar A, Terzic CM, and Terzic A (2009) Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clin Proc* 84:876–892.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O’Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, and Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9:589–595.

Glass JD, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Kelly C, and Feldman EL (2012) Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* 30:1144–1151.

Goldstein AS and Christ G (2009) Functional tissue engineering requires bioreactor strategies. *Tissue Eng Part A* 15:739–740.

Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, and DeSimone JM (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11613–11618.

Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, and Vunjak-Novakovic G (2009) Biomimetic approach to tissue engineering. *Semin Cell Dev Biol* 20:665–673.

Green H (2008) The birth of therapy with cultured cells. *Bioessays* 30:897–903.

Greiner A and Wendorff JH (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl* 46:5670–5703.

Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E et al (2010). Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res.* 70, 3718–3729. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1865.

Guan M, Yao W, Liu R, Lam KS, Nolta J, Jia J, Panganiban B, Meng L, Zhou P, and Shahnazari M, et al. (2012) Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. *Nat Med* 18:456–462.

Gupta J, Felner EI, and Prausnitz MR (2009) Minimally invasive insulin delivery in subjects with type 1 diabetes using hollow microneedles. *Diabetes Technol Ther* 11: 329–337.

Gurdon JB and Bourillot PY (2001) Morphogen gradient interpretation. *Nature* 413: 797–803.

Gurdon JB, Byrne JA, and Simonsson S (2003) Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc*

Natl Acad Sci USA 100 (Suppl 1):11819–11822.

Gurdon JB, Dyson S, and St Johnston D (1998) Cells' perception of position in a concentration gradient. *Cell* 95:159–162.

Gurdon JB, Standley H, Dyson S, Butler K, Langon T, Ryan K, Stennard F, Shimizu K, and Zorn A (1999) Single cells can sense their position in a morphogen gradient. *Development* 126:5309–5317.

Gwak J, Hwang SG, Park HS, Choi SR, Park SH, Kim H, Ha NC, Bae SJ, Han JK, and Kim DE, et al. (2012) Small molecule-based disruption of the Axin/b-catenin protein complex regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Res* 22:237–247.

Hall B, Dembinski J, Sasser AK, Studeny M, Andreeff M, and Marini F (2007) Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol* 86:8–16.

Harb N, Archer TK, and Sato N (2008) The Rho-Rock-Myosin signaling axis determines cell-cell integrity of self-renewing pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 3: e3001.

Hellmann MA, Panet H, Barhum Y, Melamed E, and Offen D (2006) Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6- hydroxydopamine-lesioned rodents. *Neurosci Lett* 395:124–128.

Hermann A, Maisel M, Wegner F, Liebau S, Kim DW, Gerlach M, Schwarz J, Kim KS, and Storch A (2006) Multipotent neural stem cells from the adult tegmentum with dopaminergic potential develop essential properties of functional neurons. *Stem Cells* 24:949–964.

Hickey P and Stacy M (2011) Available and emerging treatments for Parkinson's disease: a review. *Drug Des Devel Ther* 5:241–254.

Himburg HA, Muramoto GG, Daher P, Meadows SK, Russell JL, Doan P, Chi JT, Salter AB, Lento WE, and Reya T, et al. (2010) Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 16:475–482.

Ho IA, Toh HC, Ng WH, Teo YL, Guo CM, Hui KM, et al (2013). Human bone marrow -derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem cells* 31, 146-155. doi 10.1002/stem.1247.

Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432–438.

Howden SE, Gore A, Li Z, Fung HL, Nisler BS, Nie J, Chen G, McIntosh BE, Gulbranson DR, and Diol NR, et al. (2011) Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:6537–6542.

Hu W, Wang J, He X, Zhang H, Yu F, Jiang L, et al (2011). Human umbilical blood mononuclear cell-derived mesenchymal stem cells serve as interleukin-21 gene delivery vehicles for epithelial ovarian cancer therapy in nude mice. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58, 397-404. doi: 10.1002/bab.63

Hu YL, Huang B, Zhang TY, Miao PH, Tang GP, Tabata Y, and Gao JQ (2012) Mesenchymal stem cells as a novel carrier for targeted delivery of gene in cancer therapy based on nonviral transfection. *Mol Pharm* 9:2698–2709.

Huang NF, Lam A, Fang Q, Sievers RE, Li S, and Lee RJ (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augment angiogenesis in the chronically infarcted myocardium. *Regen Med* 4:527–538.

Hung S, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, et al (2005). Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin. Cancer Res.* 11, 7749-7756. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0876.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, and Koszka K, et al. (2009) A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 5: 491–503.

Iglesias-Garcia O, Pelacho B and Prosper F (2013) Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 62 (2013) 43-50

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M and Narumiya S (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinase, *Mol. Pharmacol*, 57, 976-983.

Istvanffy R, Kröger M, Eckl C, Gitzelmann S, Vilne B, Bock F, Graf S, Schiemann M, Keller UB, and Peschel C, et al. (2011) Stromal pleiotrophin regulates repopulation behavior of hematopoietic stem cells. *Blood* 118:2712–2722.

Jakab K, Norotte C, Marga F, Murphy K, Vunjak-Novakovic G, and Forgacs G (2010) Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* 2:022001.

James AW, Pang S, Askarinam A, Corselli M, Zara JN, Goyal R, Chang L, Pan A, Shen J, and Yuan W, et al. (2012) Additive effects of sonic hedgehog and Nell-1 signaling in osteogenic versus adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Dev* 21:2170–2178.

Jeschke MG, Herndon DN, Baer W, Barrow RE, and Jauch KW (2001) Possibilities of non-viral gene transfer to improve cutaneous wound healing. *Curr Gene Ther* 1: 267–278.

Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, and Nolta JA (2010) Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 5:933–946.

Kamata M, Liu S, Liang M, Nagaoka Y, and Chen IS (2010) Generation of human induced pluripotent stem cells bearing an anti-HIV transgene by a lentiviral vector carrying an internal murine leukemia virus promoter. *Hum Gene Ther* 21: 1555–1567.

Kanematsu A, Yamamoto S, Noguchi T, Ozeki M, Tabata Y, and Ogawa O (2003) Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor. *J Urol* 170:1633–1638.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW et al (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563. doi: 10.1038/nature06188.

Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, and Keller G (2011) Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 8:228–240.

Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Kajitani N, Hoshiya H, Hiramatsu K, Yoshino T, Kazuki K, and Ishihara C, et al. (2010) Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 18:386–393.

Keatch RP, Schor AM, Vorstius JB, and Schor SL (2012) Biomaterials in regenerative medicine: engineering to recapitulate the natural. *Curr Opin Biotechnol* 23: 579–582.

Kent DG, Copley MR, Benz C, Wöhrer S, Dykstra BJ, Ma E, Cheyne J, Zhao Y, Bowie MB, and Zhao Y, et al. (2009) Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood* 113: 6342–6350.

Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II et al (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 203, 1235-1247. doi: 10.1084/jem. 20051921.

- Khan IF**, Hirata RK, Wang PR, Li Y, Kho J, Nelson A, Huo Y, Zavaljevski M, Ware C, and Russell DW (2010) Engineering of human pluripotent stem cells by AAVmediated gene targeting. *Mol Ther* 18:1192–1199.
- Kikuno N**, Kawamoto K, Hirata H, Vejdani K, Kawakami K, Fandel T, Nunes L, Urakami S, Shiina H, and Igawa M, et al. (2009) Nerve growth factor combined with vascular endothelial growth factor enhances regeneration of bladder acellular matrix graft in spinal cord injury-induced neurogenic rat bladder. *BJU Int* 103: 1424–1428.
- Kim JH**, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, and Bankiewicz K, et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson’s disease. *Nature* 418:50–56.
- Kim JO**, Choi JY, Park JK, Kim JH, Jin SG, Chang SW, Li DX, Hwang MR, Woo JS, and Kim JA, et al. (2008) Development of clindamycin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol and sodium alginate. *Biol Pharm Bull* 31:2277–2282.
- Kimelman-Bleich N**, Pelled G, Zilberman Y, Kallai I, Mizrahi O, Tawackoli W, Gazit Z, and Gazit D (2011) Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair. *Mol Ther* 19:53–59.
- Kirik D**, Georgievska B, and Björklund A (2004) Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:105–110.
- Kitagawa M**, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A and Nakayama K. (1999). *EMBO J*.18, 2401–2410.
- Klopp AH**, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M and Marini F III (2011) Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem cells* 29, 11-19. doi: 10.1002/stem.559.
- Koyanagi M**, Takahashi J, Arakawa Y, Doi D, Fukuda H, Hayashi H, Narumiya S, and Hashimoto N (2008) Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res* 86:270–280.
- Kriks S**, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, and Buch A, et al. (2011) Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson’s disease. *Nature* 480: 547–551.

Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, and Cunningham J, et al. (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26:443–452.

Kurosawa H (2012) Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. The society for Biotechnology, Japan. *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 114 No. 6, 557-581, 2012.

Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S et al (2007). Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J. Clin. Invest.* 117, 989-996. doi: 10.1172/JCI29713.

Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, and Heywood P, et al. (2006) Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 59: 459–466.

Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ, Wettstein PJ, Blackwell C, Borson N, Hofmeister E, Schuch G, Soker S, and Moraes CT, et al. (2002) Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnol* 20:689–696.

Lazennec G and Jorgensen C (2008). Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem cells* 26, 1387-1394. doi: 10.1634/stemcells.2007-1006.

Lee WR, Park JH, Kim KH, Kim SJ, Park DH, Chae MH, Suh SH, Jeong SW, and Park KK (2009) The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. *Wound Repair Regen* 17:505–510.

Lees AJ, Hardy J, and Revesz T (2009) Parkinson’s disease. *Lancet* 373:2055–2066 PubMed.

Lees C, Howie S, Sartor RB and Satsangi J (2005). The hedgehog signaling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease. *Gastroenterology*. 129:1696-1710.

LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, and Siddiqui MS, et al. (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson’s disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 10:309–319.

Li W, Zara JN, Siu RK, Lee M, Aghaloo T, Zhang X, Wu BM, Gertzman AA, Ting K, and Soo C (2011) Nell-1 enhances bone regeneration in a rat critical-sized femoral segmental defect model. *Plast Reconstr*

Surg 127:580–587.

Li Z, Guo J, Chang Q, and Zhang A (2009) Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. Biol Pharm Bull 32:1343–1346.

Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. (2012). Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. Proc Natl Acad Sci USA;109:E1848-57

Liang DS (1962) Bladder regeneration following subtotal cystectomy. J Urol 88: 503–505.

Liang DS and Goss RJ (1963) Regeneration of the bladder after subtotal cystectomy in rats. J Urol 89:427–430.

Lim F and Sun AM (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science 210:908–910.

Lin AT, Kato K, Monson F, Wein AJ, and Levin RM (1989) Pharmacological responses of rabbit urinary bladder after subtotal cystectomy. J Urol 142:409–412.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, and Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 260: 1130–1132.

Lindsay RM, Alderson RF, Friedman B, Hyman C, Ip NY, Furth ME, Maisonnier PC, Squinto SP, and Yancopoulos GD (1991) The neurotrophin family of NGF-related neurotrophic factors. Restor Neurol Neurosci 2:211–220.

Lindvall O and Kokaia Z (2009) Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. Trends Pharmacol Sci 30:260–267.

Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F et al (2008). Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. Stem Cells 26, 279-289. doi: 10.1634/stemcells. 2007-0454.

Loai Y, Yeager H, Coz C, Antoon R, Islam SS, Moore K, and Farhat WA (2010) Bladder tissue engineering: tissue regeneration and neovascularization of HA-VEGF-incorporated bladder acellular constructs in mouse and porcine animal models. J Biomed Mater Res A 94:1205–1215.

Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D and Janes SM (2009). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL

can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res.* 69,4134-4142. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4698.

Lu TY, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama G and Yang L (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature Communications.* 4, 2304. doi: 10.1038/nsomms3307.

Luan Z, Liu W, Qu S, Du K, He S, Wang Z, Yang Y, Wang C, and Gong X (2012) Effects of neural progenitor cell transplantation in children with severe cerebral palsy. *Cell Transplant* 21 (Suppl 1):S91–S98.

Luo Y, Diao H, Xia S, Dong L, Chen J, and Zhang J (2010) A physiologically active polysaccharide hydrogel promotes wound healing. *J Biomed Mater Res A* 94: 193–204.

Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, Markoulaki S, Hanna J, Lairson LL, Charette BD, and Bouchez LC, et al. (2009) Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8912–8917.

Majumdar MK, Keande-Moore M, Buyaner D, et al., (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003.

Manfredini M, Zerbinati F, Gildone A, and Faccini R (2007) Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta Orthop Belg* 73:207–218.

Mangera A, Andersson KE, Apostolidis A, Chapple C, Dasgupta P, Giannantoni A, Gravas S, and Madersbacher S (2011) Contemporary management of lower urinary tract disease with botulinum toxin A: a systematic review of botox (onabotulinumtoxinA) and dysport (abobotulinumtoxinA). *Eur Urol* 60:784–795.

Mani G, Feldman MD, Patel D, and Agrawal CM (2007) Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials* 28:1689–1710.

Marga F, Jakab K, Khatiwala C, Shepherd B, Dorfman S, Hubbard B, Colbert S, and Gabor F (2012) Toward engineering functional organ modules by additive manufacturing. *Biofabrication* 4:022001.

McKay WF, Peckham SM, and Badura JM (2007) A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 31:729–734.

Minear S, Leucht P, Jiang J, Liu B, Zeng A, Fuerer C, Nusse R, and Helms JA (2010) Wnt proteins

promote bone regeneration. *Sci Transl Med* 2:29ra30.

Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs GD, Drake CJ, and Markwald RR (2009) Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 30: 2164–2174.

Mirza SK (2011) Folly of FDA-approval studies for bone morphogenetic protein. *Spine J* 11:495–499.

Mooney DJ and Vandenburgh H (2008) Cell delivery mechanisms for tissue repair. *Cell Stem Cell* 2:205–213.

Moore DJ, West AB, Dawson VL, and Dawson TM (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28:57–87.

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T et al (2013). Direct comparison of autologous and allogenic transplantation of iPS-derived neural cells in the brain of a Nonhuman primate. *Stem cell reports*. 10.1016/j.stemcr.2013.08.007

Morrell NT, Leucht P, Zhao L, Kim J-B, ten Berge D, Ponnusamy K, Carre AL, Dudek H, Zachlederova M, and McElhaney M, et al. (2008) Liposomal packaging generates Wnt protein with in vivo biological activity. *PLoS ONE* 3:e2930.

Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, and Kume A, et al. (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adenoassociated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 13:345–354.

Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, and Sato T, et al. (2010) A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731–1735.

Muramatsu S, Wang L, Ikeguchi K, Fujimoto K, Nakano I, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, and Nakano I, et al. (2003) Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 55:205–222.

Murry CE and Keller G (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132:661–680.

Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J et al (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65, 3307-3318. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-04-1874.

Nam YS and Park TG (1999) Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *J Biomed Mater Res* 47:8–17.

Narayanan RP, Melman G, Letourneau NJ, Mendelson NL, and Melman A (2012) Photodegradable iron(III) cross-linked alginate gels. *Biomacromolecules* 13: 2465–2471.

Nelson DM, Baraniak PR, Ma Z, Guan J, Mason NS, and Wagner WR (2011) Controlled release of IGF-1 and HGF from a biodegradable polyurethane scaffold. *Pharm Res* 28:1282–1293.

Nelson DM, Ma Z, Leeson CE, and Wagner WR (2012) Extended and sequential delivery of protein from injectable thermoresponsive hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 100:776–785.

Ng CP, Goodman TT, Park IK, and Pun SH (2009) Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility. *Biomaterials* 30:951–958.

Nirmalanandhan VS and Sittampalam GS (2009) Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *J Biomol Screen* 14:755–768.

Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plence P, Millet V, Turgeman G, Perricaudet M, and Sany J, et al. (2004) Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22: 74–85.

Norton LW, Park J, and Babensee JE (2010) Biomaterial adjuvant effect is attenuated by anti-inflammatory drug delivery or material selection. *J Control Release* 146:341–348.

Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, and Dick JE (2011) Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333:218–221.

Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, and Stacy M, et al. (2003). ICV GDNF Study Group. Implanted intracerebroventricular. Glial cell line-derived neurotrophic factor Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60:69–73.+

Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M and Vacanti CA (2014a). Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 505, 641-647 (30 January 2014). doi:10.1038/nature12968.

Obokata H, Sasai Y, Niwa H, Kadota M, Andrabi M, Takata N, Tokoro M, Terashita Y, Yonemura S, Vacanti CA and Wakayama T (2014b). Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature* 505, 676-680 (30 January 2014). doi:10.1038/nature12969.

Ohgushi M and Sasai Y (2011). Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states, *Trends Cell Biol.* 21, 274-282.

Opара EC, Mirmalek-Sani SH, Khanna O, Moya ML, and Brey EM (2010) Design of a bioartificial pancreas(+). *J Investig Med* 58:831–837.

Omolola Eniola A and Hammer DA (2005) In vitro characterization of leukocyte mimetic for targeting therapeutics to the endothelium using two receptors. *Biomaterials* 26:7136–7144.

Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S and Bhattacharya J (2009). Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 113, 4197-4205. doi: 10.1182/blood-2008-09-176198.

Ozawa K, Fan DS, Shen Y, Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogawa M, Urabe MK, Kume A, and Nakano I (2000) Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J Neural Transm Suppl* 58:181–191.

Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, Pabon L, Reinecke H, and Murry CE (2010) Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 5:e11134.

Patterson M, Chan DN, Ha I, Case D, Cui Y, Van Handel B, Mikkola HK, and Lowry WE (2012) Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell Res* 22:178–193.

Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, and L'Heureux N (2012) The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs* 195:144–158.

Peyton CC, Burmeister D, Petersen B, Andersson KE, and Christ G (2012) Characterization of the early proliferative response of the rodent bladder to subtotal cystectomy: a unique model of mammalian organ regeneration. *PLoS ONE* 7: e47414.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147. doi: 10.1126/science.284.5411.143.

Politis M and Lindvall O (2012) Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med* 10:1.

Porada CD and Almeida-Porada G (2010) Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 62:1156–1166.

Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X and Mifflin RC (2011). Mesenchymal stem cells of the intestinal lamina propria. *Annu. Rev. Physiol.* 73,213-237. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100646.

Rafat M, Rotenstein LS, Hu JL, and Auguste DT (2012) Engineered endothelial cell adhesion via VCAM1 and E-selectin antibody-presenting alginate hydrogels. *Acta Biomater* 8:2697–2703.

Rahman SH, Maeder ML, Joung JK, and Cathomen T (2011) Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Hum Gene Ther* 22:925–933.

Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AL, Caspi I et al (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*. 502. 65-70. doi: 10.1038/nature12587.

Ramaswamy S, Soderstrom KE, and Kordower JH (2009) Trophic factors therapy in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 175:201–216.

Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, and Hubbell JA (2007) Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol* 25:1159–1164.

Reyblat P and Ginsberg DA (2010) Augmentation enterocystoplasty in overactive bladder: is there still a role? *Curr Urol Rep* 11:432–439.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al., (2001). Purification and ex-vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001.

Riento K and Ridley AJ (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behavior, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 446-456.

Riley J, Federici T, Polak M, Kelly C, Glass J, Raore B, Taub J, Kesner V, Feldman EL, and Boulis NM (2012) Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I safety trial, technical note, and lumbar safety outcomes. *Neurosurgery* 71:405–416, discussion 416.

Ritter E, Perry A, Yu J, Wang T, Tang L and Bieberich E (**2008**). Breast cancer cell-derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemoattractants for bone marrow stromal stem cells. *Ann. Surg.* 247, 310-314. doi: 10.1097/SLA.0b013e31816401d5.

Rogers KW and Schier AF (2011) Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:377–407.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S and Polakis P (**1996**). Binding of GSK3-beta to the APC-beta-catenina complex and regulation of complex assembly. *Science*. Doi: 10.1126/science.272.5264.1023.

Sandner B, Prang P, Rivera FJ, Aigner L, Blesch A, and Weidner N (**2012**) Neural stem cells for spinal cord repair. *Cell Tissue Res* 349:349–362.

Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, and Labow RS (**2005**) Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 26:7457–7470.

Sapir Y, Kryukov O, and Cohen S (**2011**) Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration. *Biomaterials* 32:1838–1847.

Saul JM, Ellenburg MD, de Guzman RC, and Van Dyke M (**2011**) Keratin hydrogels support the sustained release of bioactive ciprofloxacin. *J Biomed Mater Res A* 98: 544–553.

Schwarz SC, Wittlinger J, Schober R, Storch A, and Schwarz J (**2006**) Transplantation of human neural precursor cells in the 6-OHDA lesioned rats: effect of immunosuppression with cyclosporine A. *Parkinsonism Relat Disord* 12:302–308.

Scuderi N, Onesti MG, Bistoni G, Ceccarelli S, Rotolo S, Angeloni A, and Marchese C (**2008**) The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold. *Biomaterials* 29:1620–1629.

Seita J and Weissman IL (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:640–653.

Shah DA, Kwon SJ, Bale SS, Banerjee A, Dordick JS, and Kane RS (**2011**) Regulation of stem cell signaling by nanoparticle-mediated intracellular protein delivery. *Biomaterials* 32:3210–3219.

Shen G, Hu Y, Wu J, Jin K, Zhu D, Zhang Y, Yu Y, and Lou Y (**2012a**) A 2,6- disubstituted 4 anilinoquinazoline derivative facilitates cardiomyogenesis of embryonic stem cells. *ChemMedChem*

7:733–740.

Shen Y, Muramatsu SI, Ikeguchi K, Fujimoto KI, Fan DS, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, and Nagatsu I, et al. **(2000)** Triple transduction with adenoassociated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11:1509–1519.

Sheridan B and Harris N (2009) New glossary of terms used in regenerative medicine: standardization continues to emerge as regenerative medicine matures. *Regen Med* 4:621–622.

Shi W, Mei H, Deng J, Chen C, Wang H, Guo T, Zhang B, Li L, Pang Z, and Jiang X, et al. **(2012)** A tissue factor targeted nanomedical system for thrombi-specific drug delivery. *Biomaterials* 33:7643–7654.

Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, and Ding S **(2008)** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 3:568–574.

Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y et al **(2010)**. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *J . int. Cancer* 127, 2323-2333. doi: 10.1002/ijc.25440.

Shulman JM, De Jager PL, and Feany MB **(2011)** Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 6:193–222.

Sidhu KS (2011) New approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 11:569–579.

Sill TJ and von Recum HA (2008) Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29:1989–2006.

Sisk V and Neu I (1939) Regeneration of the bladder: a case study. *Trans Am Assoc Genito-urin Surg* 32:197–202.

Siu RK, Lu SS, Li W, Whang J, McNeill G, Zhang X, Wu BM, Turner AS, Seim HB 3rd, and Hoang P, et al. **(2011)** Nell-1 protein promotes bone formation in a sheep spinal fusion model. *Tissue Eng Part A* 17:1123–1135.

Smith A (2006) A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441:1060.

Snykers S, Henkens T, De Rop E, Vinken M, Fraczek J, De Kock J, De Prins E, Geerts A, Rogiers V, and Vanhaecke T (2009) Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *J Hepatol* 51:187–211.

Soder BL, Propst JT, Brooks TM, Goodwin RL, Friedman HI, Yost MJ, and Gourdie RG (2009) The connexin43 carboxyl-terminal peptide ACT1 modulates the biological response to silicone implants. *Plast Reconstr Surg* 123:1440–1451.

Srivastava D, Ieda M, Fu J and Qian L (2012) Cardiac Repair with thymosin beta4 and cardiac reprogramming factors. *Ann N Y Acad Sci*;1270:66-72

Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, and Andreeff M (2002) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62:3603–3608.

Studený M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, and Andreeff M (2004) Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96:1593–1603.

Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.

Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E et al (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track -letter. *Cancer Res.* 70, 6393-6396. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-10-1305.

Trounson A, Thakar RG, Lomax G, and Gibbons D (2011) Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 9:52.

Tucci P and Haralambidis G (1963) Regeneration of the bladder: review of literature and case report. *J Urol* 90:193–199.

Turner R, Gerber D, and Reid L (2010) The future of cell transplant therapies: a need for tissue grafting. *Transplantation* 90:807–810.

Turner RA, Wauthier E, Lozoya O, McClelland R, Bowsher JE, Barbier C, Prestwich G, Hsu E, Gerber

DA, and Reid LM (2013) Successful transplantation of human hepatic stem cells with restricted localization to liver using hyaluronan grafts. *Hepatology* 57:775–784.

Uccelli A, Moretta L and Pistoia V (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726-736. doi: 10.1038/nri2395.

Uehata, M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Marishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M and Narumiya S (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension, *Nature*, 389, 990-994.

Vaccarezza M, Delbello G and Zauli G (2007). A role of the TRAIL-TRAIL receptor system in the pathogenesis of diabetes. *ACTA BIOMED*, 78. Suppl 1: 262-267

Vogel W, Grunebach F, Messam CA, et al., (2003). Heterogeneity among human bone marrow derived mesenchymal stem cells and neural progenitors. *Haematologica*.

Walasek MA, van Os R, and de Haan G (2012) Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci* 1266:138–150.

Wang H, Hao J, and Hong CC (2011a) Cardiac induction of embryonic stem cells by a small molecule inhibitor of Wnt/b-catenin signaling. *ACS Chem Biol* 6:192–197.

Wang Q, Xu X, Li J, Liu J, Gu H, Zhang R, Chen J, Kuang Y, Fei J, and Jiang C, et al. (2011b) Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 21:1424–1435.

Watanabe K, UenoM, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, and Muguruma K, et al. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25:681–686.

Watts KL, Adair J and Kiem HP (2011) Hematopoietic stem cell expansion and gene therapy. *Cytotherapy* 13:1164–1171.

Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, and Reynolds BA (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16:7599–7609.

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine- Paton M, Isacson O, and Jaenisch R (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the

fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5856–5861.

Wessely R (2010) New drug-eluting stent concepts. *Nat Rev Cardiol* 7:194–203.

Willems E, Spiering S, Davidovics H, Lanier M, Xia Z, Dawson M, Cashman J, and Mercola M (2011) Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potentially promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm. *Circ Res* 109:360–364.

Willerth SM, Rader A and Sakiyama-Elbert SE (2008) The effect of controlled growth factor delivery on embryonic stem cell differentiation inside fibrin scaffolds. *Stem Cell Res (Amst)* 1:205–218.

Williams DF (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30:5897–5909.

Wilson PA, Lagna G, Suzuki A, and Hemmati-Brivanlou A (1997) Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development* 124:3177–3184.

Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ and Harper JW (1999). *Genes Dev.* 13. 270-283.

Wolpert L (2011) Positional information and patterning revisited. *J Theor Biol* 269: 359–365.

Wong GK and Chiu AT (2011) Gene therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cells: applications in monogenic disease treatment. *Biotechnol Adv* 29:1–10.

Wright LD, Young RT, Andric T, and Freeman JW (2010) Fabrication and mechanical characterization of 3D electrospun scaffolds for tissue engineering. *Biomed Mater* 5:055006.

Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, and Ma Y (2009) Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:808–813.

Yamanaka S and Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704–712.

Yau WW, Tang MK, Chen E, Yaoyao, Wong IW, Lee HS, and Lee KKh (2011) Cardiogenol C can induce mouse hair bulge progenitor cells to transdifferentiate into cardiomyocyte-like cells. *Proteome Sci* 9:3.

Youssif M, Shiina H, Urakami S, Gleason C, Nunes L, Igawa M, Enokida H, Tanagho EA, and Dahiya R (2005) Effect of vascular endothelial growth factor on regeneration of bladder acellular matrix graft: histologic and functional evaluation. *Urology* 66:201–207.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, and Stewart R, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920.

Yuan X, Li W, and Ding S (2011a) Small molecules in cellular reprogramming and differentiation. *Prog Drug Res* 67:253–266.

Yuan X, Wan H, Zhao X, Zhu S, Zhou Q, and Ding S (2011b) Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem Cells* 29:549–553.

Zhang X, Ting K, Bessette CM, Culiati CT, Sung SJ, Lee H, Chen F, Shen J, Wang JJ, and Kuroda S, et al. (2011) Nell-1, a key functional mediator of Runx2, partially rescues calvarial defects in Runx2(+/-) mice. *J Bone Miner Res* 26:777–791.

Zhang X, Zara J, Siu RK, Ting K, and Soo C (2010) The role of NELL-1, a growth factor associated with craniosynostosis, in promoting bone regeneration. *J Dent Res* 89:865–878.

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, and Xu Y (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474:212–215.

Zhu S, Song D, Jiang X, Zhou H, and Hu J (2011) Combined effects of recombinant human BMP-2 and Nell-1 on bone regeneration in rapid distraction osteogenesis of rabbit tibia. *Injury* 42:1467–1473.

Zou X, Shen J, Chen F, Ting K, Zheng Z, Pang S, Zara JN, Adams JS, Soo C, and Zhang X (2011) NELL-1 binds to APR3 affecting human osteoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett* 585:2410–2418.